Aus der Frauenklinik der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. Hans Roemer

# Untersuchungen über die Aktivitäten von Cystinaminopeptidase (CAP) und Leucinaminopeptidase (LAP) im Serum von Schwangeren

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
**Gudula Witzik**
aus Glandorf

1970

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547603_0118

Aus der Frauenklinik der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. Hans Roemer

# Untersuchungen über die Aktivitäten von Cystinaminopeptidase (CAP) und Leucinaminopeptidase (LAP) im Serum von Schwangeren

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
**Gudula Witzik**
aus Glandorf

1970

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

| | |
|---|---|
| Dekan: | Professor Dr. J. Hirschmann |
| 1. Berichterstatter: | Professor Dr. G. Jung |
| 2. Berichterstatter: | Professor Dr. H. Roemer |

Herrn Professor Dr. G.Jung danke ich
für die Überlassung des Themas und Herrn
Dr. V. Unbehaun für die freundliche Unter-
stützung und die wertvollen Anregungen
bei der Durchführung der Arbeit.

Inhaltsverzeichnis:
==========


| | Seite |
|---|---|
| A. Einleitung | 1 |
| 1. CAP | 1 |
| 2. LAP | 8 |
| B. Methodik | |
| 1. Bestimmung der Enzymaktivitäten | 13 |
| a) CAP | 13 |
| b) LAP | 16 |
| c) Ergebnisse | 20 |
| 2. Säulenchromatographische Fraktionierung | 20 |
| a) Bestimmung der CAP | 22 |
| b) Bestimmung der LAP | 23 |
| 3. Placentaextrakt | 24 |
| C. Ergebnisse | |
| 1. Elutionsprofile Nichtschwangerer | 24 |
| 2. Elutionsprofile gesunderer Schwangerer | 25 |
| 3. Elutionsprofile der Placenten | 26 |
| 4. Immunelektrophorese | 26 |
| D. Diskussion | 41 |
| E. Zusammenfassung | 44 |
| F. Literaturverzeichnis | 46 |

# UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE AKTIVITÄTEN VON CAP UND LAP IM SERUM VON SCHWANGEREN

## A. Einleitung:

### 1. CAP:

Fekete (17) entdeckte 1930 als erster die Fähigkeit des Schwangerenserums, Oxytocin zu inaktivieren. Dieses oxytocinabbauende Prinzip wurde als Monoaminopeptidase beschrieben und als Serumoxytocinase bezeichnet (63,81).

Es handelt sich dabei um Enzymaktivitäten von Aminopeptidasecharakter, die die biologische Aktivität von Oxytocin, gemessen am Uterus der Ratte oder an der milchejizierenden Wirkung am lactierenden Kaninchen, durch hydrolytische Spaltung der Cysteinyl- Tyrosinbindung des Oktapeptids Oxytocin zerstören (26).

Du Vignaud und Tuppy (80) konnten die Strukturformel von Oxytocin aufklären und das Oktapeptid synthetisieren, während Wintersberger und Tuppy (78) hochgereinigte Oxytocinase aus Retroplacentarserum darstellten und die Oxytocinase als Cystinaminopeptidase charakterisierten. Alle Oxytocinaseaktivitäten können gleichzeitig Cystin - di - β - naphthylamid spalten, wobei jedoch nicht jede Cystin - di - β - naphthylamid spaltende Aktivität und jede Spaltung des Oktapeptids zwischen Cystein und Tyrosin spezifisch ist für den Nachweis der Oxytocinase (84), sondern auch von anderen in allen Seren vorkommenden Aminopeptidasen bewirkt werden kann (64).

Neben dem biologischen Nachweis von Oxytocin wurde durch Tuppy und Mit. (44) eine chemische Methode entwickelt, bei der Oxytocinase die Spaltung chromogener Substanzen wie Cystin - di - β - naphthylamid und

Cystin - di - paranitroanilid katalysiert. Zwischen beiden Nachweismethoden besteht eine hohe Übereinstimmung. Nur bei geringer Plasmaoxytocinaseaktivität ergibt die chemische Methode höhere Werte gegenüber der biologischen.
Man unterscheidet bei den oxytocinabbauenden Enzymaktivitäten die Serumoxytocinase der Schwangeren, die sich im Serum und Plasma nachweisen läßt (51) und die Gewebsoxytocinase der Organe, die in Leber, Pancreas (9), Placenta, Uterus, Ovar, Milz, Niere, Haut (70), Milchdrüsen, Lunge, Herzmuskel, Erythrocyten, im Serum von Männern und nichtschwangeren Frauen (35) gefunden wurde.
Chemisch lassen sich beide Oxytocinaseformen trennen, da die Gewebsoxytocinase nicht durch Äthylendiamintetraacetat (EDTA) hemmbar ist.
Page (84) wies nach, daß die Oxytocinase cyclusabhängig ist. Zur Zeit der Ovulation steigt sie an und sinkt während der Menstruation auf einen niederen Wert herab.
1940 bemerkten Werle und Effkemann (81), daß die Oxytocinabbauende Wirkung des Serums bald nach Beginn einer Schwangerschaft auftritt, und daß im Laufe der Gravidität ein kontinuierlicher Aktivitätsanstieg mit einem Maximum zum Zeitpunkt der Geburt erfolgt. Dieser Aktivitätsanstieg von Oxytocinase wurde von vielen Autoren bestätigt. Er ließ sich jedoch nur im Serum gravider Primaten mit einer Placenta haemochorialis olliformis nachweisen (64).
Babuna und Yenen (2) gaben einen niedrigen CAP-Spiegel zu Beginn der Schwangerschaft an, einen steilen Anstieg ab der 16. Woche post conceptionem mit Höchstwerten am Ende der Tragzeit. Centaro und Mit. (15) stellten einen zunehmenden Anstieg vom 2. Trimester an fest. Sie fanden ein Maximum unter der Geburt mit

erheblicher Oxytocinaseaktivität im Myometrium, keinen steilen Abfall vor Geburtsbeginn und ein langsames Absinken einige Tage danach. Semm (65) beschreibt eine Aktivitätszunahme vom 16. Tag post conceptionem bis zur 36. Woche, einen plateauförmigen Verlauf bis zu einigen Stunden post partum.
Nach Werle und Semm (82) steigt die CAP um den 50 - 100fachen Wert gegenüber Nichtschwangeren, nach Page (50,51) ist sie bei Kreißenden 1000 mal höher. Titus u.a. (76) wiesen einen 25fachen, Ryden (59), Müller-Hartburg (47) einen 18fachen und Tuppy und Nesvadba (77) einen 13fachen Aktivitätszuwachs nach. Klimek (34) gibt im Bereich von ph 7,8 eine 18fache, bei ph 6 dagegen nur eine 4,7fache Zunahme gegenüber Nichtschwangeren an.
Die unterschiedlichen Ergebnisse beruhen auf dem verschiedenen Nachweis durch biologische und chemische Methoden.
Alle obengenannten und weiteren Autoren (49,53,11,34, 76) beschreiben, daß der Fermentspiegel bis zum Geburtseintritt gleich hoch bleibt und in einigen Tagen bis Wochen post partum auf den Wert Nichtschwangerer zurücksinkt, während Beller und Goebelsmann (7,8) einen praenatalen Abfall für wahrscheinlich halten.
Ebenso wie im Serum haben verschiedene Autoren die CAP in Placentahomogenaten nachgewiesen. Bei den Untersuchungen ergaben sich zwei ph-Optima zur Inaktivierung von Oxytocinase: ph 6 in Übereinstimmung mit anderen Geweben und ph 7-7,5 mit der höchsten Oxytocinasekonzentration und 4 mal höheren Enzymwerten als im Serum (68).
Nach Ausschluß der schwangerschaftsunspezifischen Gewebsoxytocinase fand Bernhard (10) die Aktivität in der Placenta 6,9 mal höher als im Serum. Im Gegensatz zu den ante partum plateauförmig verlaufen-

den Serumwerten ergab sich bei den Placentawerten ein leichter, allerdings statistis ch nicht signifikanter Abfall.
Riad (53) gibt 5-10 mal, Ryden (59) ebenso 10 mal höhere Aktivitäten der Placenta an. Bei 30 Placenten, in denen Semm (67) den Serumoxytocinasegehalt bestimmte, schwankte der CAP-Wert mit großer Konstanz um den Mittelwert. Die Aktivität wurde in Beziehung zur Schwangerschaftsdauer, zum Gesamtgewicht der Placenta und zum Gewicht des Kindes gesetzt. Allerdings fand sich keine direkte Proportionalität zu den angegebenen Größen.
Die Bedeutung der CAP liegt nach dem Semm (64) in der Inaktivierung des Hypophysenhinterlappenhormons Oxytocin. Sie dient damit einer fast völligen Ruhigstellung des Uterus hinsichtlich seiner Spontanmotilität. Die "schützende" Rolle des oxytocinolytisch wirkenden Enzyms auf den graviden Uterus erwägen auch Messina und Cisterno (35).
Ryden (59) hält die Plasmaoxytocinase eventuell für ein protektives Enzym gegen die in der Schwangerschaft beobachtete Aktivität des Renin-Angiotensin-Mechanismus. Es wird hierbei angenommen, daß Oxytocinase durch Inaktivierung von Angiotensin und Vasopressin die placentaren Gefäße vor der Vasokonstriktion durch Angiotensin schützt. Ryden konnte die Oxytocinase in Ammion, Decidua und Myometrium nachweisen. Die höchste spezifische Aktivität lag im Chorion. Da die Placenta 10 mal höhere Aktivitäten aufweist, vermutet er, wie auch Miller u.a. (46), Semm (69), Page und Mit. (51), daß die Placenta, wahrscheinlich der Syncytiotrophoblast, der Ursprungsort der Serumoxytocinase ist.
Nach Page (51) entspricht die Aktivitätszunahme der Gewichtszunahme der Placenta, und die Höhe der Akti-

vität gilt als Maß für die Funktion der Placenta. Für eine placentare Herkunft des Enzyms spricht auch die Tatsache, daß die in Placentahomogenaten gefundene Oxytocinaseaktivität nicht wie die Oxytocinaseaktivität im Serum durch EDTA zu inhibieren ist. Verschiedene Autoren versuchen auf Grund der Aktivitätsbestimmung der CAP Aussagen über pathologische Schwangerschaften machen zu können. Die Ergebnisse sind jedoch zum Teil recht unterschiedlich. Einheitlich berichten Babuna, Yenen (28), Ichaliotis, Lambrinopoulos (27), Melander (44), Messina, Cisterno (35), Miller u.a. (46) über eine Erhöhung der Serumenzymkonzentration bei Mehrlingsschwangerschaften. Ichaliotis sieht die Ursache der Aktivitätssteigerung im Schutz des Foeten vor der vermehrten Motilität des Uterus auf Grund seiner größeren Ausdehung. Verantwortlich für diesen Schutz ist nicht die Größe der Placenta, sondern ihre funktionelle Kapazität. Während Melander (44) bei intrauterinem Fruchttod, Abortus imminens, completus und incompletus normale Werte erhält, stellen Babuna und Yenen (2,3) bei Fruchttod und Übertragung ein Absinken der CAP fest. Ebenso nehmen Franceschelli und Leone (19) eine verminderte Ansprechbarkeit der Uterusmuskulatur auf Oxytocinase an, da trotz verminderter CAP-Aktivität bei gleichbleibender Produktion die Wehen in Gang kommen. Lambrinopoulos (38,39) spricht dagegen von einem signifikanten Anstieg bei Übertragung, Ichaliotis (27) von einem Abfall bei Praeeklampsie. Bernhard und Semm (16) fanden eine verminderte Oxytocinaseaktivität bei Gestosepatientinnen und deuten die Aktivitätsverminderung als Ausdruck der Placentainsuffizienz. Zusammenfassend läßt sich sagen, daß sich zwischen Oxytocinaseaktivität und Wehenbeginn, vorzeitigem Geburtsbeginn, primärer oder sekundärer Wehenschwäche keine Beziehung finden läßt.

Bei Auftrennung der Serumproteine durch Stärkegelelektrophorese entdeckten Smithies und Giblett in der Schwangerschaft eine neue Proteinzone, die sie als "pregnancy zone" bezeichneten. Page u.a. (71) fanden 2 neue Bande $CAP_1$ und $CAP_2$, die sich langsamer als die schnell wandernde LAP-Bande bewegen, wobei $CAP_1$ der LAP am nächsten ist, während $CAP_2$ der $\beta$-Globulinfraktion folgt (Transferrin). Afonso und de Alvarez (1) haben nun die Frage aufgeworfen, ob die "pregnancy zone" und die von Page gefundene CAP-Bande identisch sind. Sie kamen durch weitere Untersuchungen zu dem Schluß, daß das Globulin der "pregnancy zone" nicht mit der Oxytocinase übereinstimmt, sondern daß jedes dieser Enzyme ein verschiedenes Protein darstellt, das in der Stärkegelelektrophorese verschieden schnell wandert.
Auch Robinson, London, Pierce (57) haben im Anschluß an die Stärkegelelektrophorese zwei schwangerschaftsspezifische CAP identifiziert, außerdem eine nicht schwangerschaftsspezifische LAP und weitere Aminopeptidasen. Wintersberger und Tuppy (84) bewiesen das Auftreten einer zweiten langsamer wandernden Bande, die wesentlich schneller als die auch bei Nichtschwangeren nachweisbare Aminopeptidase L - cystin - di - $\beta$ - naphthylamid spaltet. Also handelt es sich bei dieser zweiten Bande, die am Ende der Graviditat die erste an Intensität übertrifft, um die Serum-Oxytocinase.
Bei vertikaler Elektrophorese findet Semm (64) Serum-Oxytocinase angelehnt an $\alpha_2$ - Globulin auf der kathodischen Seite des Albuminstromes, und Smith, Kutenberg (74) neben normaler LAP ein Enzym, das der CAP entspricht. Beide Wanderungszonen liegen sehr nahe zusammen, so daß es im frühen Stadium der Schwangerschaft schwierig ist, beide Enzyme zu identifizieren.

Bei der Auftrennung der Seren nach der gleichen Methode geben Glendening und Mit. (21) an, daß die Aminopeptidaseaktivität auf drei Banden verteilt ist. Die am schnellsten wandernde, auch im Serum Nichtschwangerer vorkommende Bande bezeichnen sie als LAP, die zwei anderen ab der 16. Woche nachweisbaren Banden als $CAP_1$ und $CAP_2$.

Einen immunbiologischen Nachweis der Oxytocinase führt Rittner (56). Danach treten in der Gravidität zwei Eiweißkörper im $\alpha_2$ - und $\beta$-Bereich auf. Bei der vertikalen Stärkegelelektrophorese ergibt sich eine Bande im $\alpha_2$ - Bereich mit der gleichen elektrophoretischen Beweglichkeit wie die "pregnancy zone" von Smithies und die zweite unregelmäßig auftretende Bande im $\beta$ - Bereich, die eventuell mit der $CAP_1$ nach Page identisch ist.

Papierelektrophoretisch konnten Riad und Scandrett (54) das Maximum der Enzymaktivität gegen L - Systin - di - $\beta$ - naphthylamid an der Kathodenseite der $\alpha_1$ - Globulinfraktion nachweisen, das sich zum Teil mit den $\alpha_2$ - Globulinen überschnitt, jedoch keine Aktivität im Albumin, $\beta$ und $\gamma$ - Globulinbereich zeigte.

Weitere Ergebnisse über die Proteinfraktionen des Serums wurden durch säulenchromatographische Untersuchungen gewonnen. Bei der Auftrennung von retroplacentarem Serum an DEAE - Cellulose konnte Sjöholm (72) zwei aktive Enzymkomponenten und durch Gelfiltration an der Sephadex G-200 Säule zwei CAP-peaks und drei Proteinhauptzonen darstellen, wobei die CAP zwischen der ersten und zweiten Zone lokalisiert war.

Zur Trennung von LAP und CAP haben Goetelsmann und Beller (22) ebenso Serum an Sephadex G200 fraktioniert und dabei drei unvollständig getrennte Proteingipfel gefunden, die mit $\alpha_2$-$\beta$ Makroglobulinen, $\gamma$ - Globulinen und Albuminen korrespondieren. Ein LAP -

aktiver Gipfel war bei Schwangeren und Nichtschwangeren vorhanden, während ein zweiter LAP-peak, unvollständig vom ersten getrennt, nur in der Gravidität auftrat. Entsprechend ergab sich ein LAP-peak in derselben Fraktion.

2. LAP:

Neben dem Anstieg von Cystinaminopeptidase findet sich auch eine Zunahme von Leucinaminopeptidase im Laufe der Schwangerschaft. 1929 wurde die LAP von Linderstrøm-Lang (41) im Darmerepsin entdeckt.
Es handelt sich dabei um eine relativ unspezifische Exopeptidase, die unabhängig von der Kettenlänge des Substrates bevorzugt den N - terminalen L - Leucin - Rest von Aminosäureamiden, Polypeptiden und Peptidamiden spaltet (26). Als optimale Substrate gelten L - Leucinamid, L - Leucylglycin, L - Leucylglycylglycin und L - Leucyl - β - naphthylamid (73,24), die in unterschiedlichem Ausmaß gespalten werden und somit die Heterogenität des Enzyms beweisen, für die auch die verschieden starke Inhibierung durch EDTA spricht. Aktivierbar ist es durch $Co^{++}$, $Mg^{++}$, $Mn^{++}$.

LAP ist weit verbreitet in allen menschlichen, tierischen, pflanzlichen Organen, In Körperflüssigkeiten und Pleura- und Peritonealergüssen (42,52). Ihre Bedeutung innerhalb des Stoffwechsels ist noch nicht genau geklärt. Sie soll eine Rolle im Proteinmetabolismus spielen (86) und eventuell an der Endpnase der Eiweißaufspaltung beteiligt sein durch Übertragung der Peptidmoleküle oder Aufspaltung der Peptidbindung (23).
Eine Erhöhung der LAP-Aktivität im Serum findet sich bei Lebererkrankungen mit Zellnekrosen, bei Cholostase, Verschlußikterus, akuter Hepatitis, akuter Pancreatitis, bei Lebermetastasen bzw. neoplastischen

Infiltraten (M. Hodgkin). Es läßt sich aber keine differentialdiagnostische Aussage machen über malignen und benignen Verschluß, über mechanischen Ikterus und Leberzellschaden (52,48,62,61,18,30).
Ebenso wurde ein statistisch signifikanter Anstieg des Mittelwertes nach Einnahme von Ovulationshemmern beobachtet, wobei einzelne Werte sogar im pathologischen Bereich lagen (83).
Verschiedene Autoren geben eine LAP-Erhöhung in der Schwangerschaft an. Nach Zsolnai und Mit. (86) ist der Durchschnittswert der Aktivität bereits in den ersten zwei Schwangerschaftsmonaten höher als normal. Die Aktivität steigt parallel zur fortschreitenden Schwangerschaft und liegt am Ende 6-7fach über dem Normalwert Nichtschwangerer. Der Abfall erfolgt nicht unmittelbar post partum, sondern normalisiert sich etwa in der dritten Woche nach der Geburt. Fortlaufende Bestimmungen der LAP-Aktivität in sämtlichen Schwangerschaftsperioden, während der Entbindung und im Wochenbett, ergaben starke individuelle Schwankungen innerhalb derselben Schwangerschaftsabschnitte, obwohl die für eine Gravidität charakteristischen Veränderungen in allen Fällen eindeutig waren. Der Enzymanstieg wird vermutet als Folge der in irgendeinem Organ entstehenden Enzymeiweißvermehrung. Da in der Schwangerschaft hauptsächlich Placenta und Decidua in Betracht kommen, wurden Homogenate dieser Organe untersucht. Dabei fand sich in der 4-12wöchigen und 10monatigen Placenta kein Unterschied der LAP - Aktivität. Es liegt also in der Placenta kein kontinuierlicher Anstieg wie im Serum vor.
Casol, Bonow (14) berichten am Ende der Gravidität von einem 10fachen Anstieg gegenüber Nichtschwangeren, Kimbach, Schreiner über einen 15,3fachen Anstieg (55) und einen raschen Abfall in den ersten Tagen post partum.

Sabatini und Mit. (60) geben einen 5fachen Anstieg im letzten Trimester an, wobei die Verfasser einen Zusammenhang zwischen der Enzymerhöhung um die Geburt und den biochemischen Veränderungen der Uterusmuskelzelle sehen. Nach Jonek und Mit. ist der hohe LAP - Spiegel im mütterlichen Serum bedingt durch einen Enzymaustritt aus der Placenta (29), in der im 1.Trimester der Cyto- und Syncytiotrophoblast die höchste Aktivität aufweisen, im 2. Trimester die LAP-Aktivität an den Placentahaftstellen, und im 3. Trimester am Zottenstroma besonders hoch ist. Nach Klaus (31, 30) ist die Erhöhung der LAP-Aktivität in der Schwangerschaft hauptsächlich auf eine Fermentsynthese der Placenta zurückzuführen, da sich bei Blasenmole keine Erhöhung zeigt. Es wird jedoch diskutiert, daß auch in anderen Organen eine vermehrte Produktion stattfindet. Post partum tritt ein schneller Rückgang der Aktivität innerhalb der ersten vier Tage ein, bis in den folgenden 3 - 4 Wochen die Normwerte wieder erreicht werden.

Kokot und Cekánski (36) geben im 10. Lunarmonat 2,5 mal höhere Werte an und vermuten, daß der LAP - Anstieg nicht Folge eines höheren Fermentniveaus ist, sondern das Resultat der hydrolytischen Einwirkung von Oxytocinase auf das bei der LAP-Bestimmung angewandte Substrat.

In Bezug auf pathologische Schwangerschaften zeigen Kleiner und Mit. (33), daß die LAP-Aktivität bei Wehenanomalien, Frühgeburten und Praeeklampsie im Normbereich liegt, während sie bei Placentainsuffizienz und Chorionepitheliom erniedrigt und bei Blasenmole erhöht ist. Lewis (40) spricht auch von Aktivitätsveränderungen bei Blasenmole und Trophoblastentumoren, mißt aber der Aktivitätsbestimmung keine differentialdiagnostische Bedeutung bei.

Histochemische Lokalisation und Ähnlichkeit zwischen Mobilität der Serum- und Gallen-LAP sprechen dafür, daß LAP unter normalen Verhältnissen aus Gallenwegen, Leber, Pancreas und Darm stammt. Diese Vermutung Zsolnais u.a. (86) wird durch die Tatsache unterstützt, daß eine hochgradige Steigerung der LAP-Aktivität nur bei Erkrankungen der obengenannten Organe vorkommt, obwohl LAP in nahezu sämtlichen Organen nachgewiesen werden konnte. Der Enzymanstieg in der Schwangerschaft wird vor allem auf einen placentaren Ursprung zurückgeführt. Die Tatsache, daß die Aktivitätserhöhung im Serum nicht mit der Enzymmenge der Placenta parallel geht, schließt den placentaren Ursprung nicht aus, da das Gewicht bis zum Ende der Gravidität auf das 20-30fache der 4-12wöchigen Placenta anwächst.

Elektrophoretische Untersuchungen über die Leucinaminopeptidase im Serum Gravider ergaben bei Smith, Pineda, Rutenberg (75), Meade, Rosalki (43), Kowlessar, Haeffner, Gleisenger (37), Concustell-Bas, Villar-Palari (16) eine aktive Bande, während Schobel und Wewalka (61) in normalen Seren ein bis zwei, in der Schwangerschaft drei Banden angeben und bei hepatobiliären Erkrankungen bis zu 7 Fraktionen fanden. Nach Meade und Rosalki findet sich die im Serum vorhandene Bande im $\alpha_1$- Bereich, während sie am Ende der Gravidität im $\alpha_2$- Globulinbereich analog dem Placentaextrakt auftritt. Auch Smith, Pineda, Rutenberg (75) geben an, daß die LAP mit der $\alpha_1$ - Globulinfraktion wandert, und daß während einer Schwangerschaft eine zweite Bande im $\alpha_2$- Bereich auftritt. Behal, Kanavage, Hamilton (6) trennten die LAP an DEAE-Cellulose säulenchromatographisch auf und konnten dabei im Gegensatz zur Elektrophorese vier LAP-aktive Fraktionen aufzeigen.

Beckman, Björling und Christodoulon (3) fanden durch Stärkegelelektrophorese eine LAP-Bande in normalem Serum nach, die zwischen Albumin und Transferrin wandert. Eine zweite LAP-Bande mit geringerer elektrophoretischer Beweglichkeit trat in der Schwangerschaft auf. Eventuell entspricht die LAP im Serum Gravider der Serumoxytocinase.
Beckman und Grivea (4) fanden in der Schwangerschaft drei LAP-Banden und vier verschiedene Zonen in Placentaextrakten, die allerdings nicht mit dem Serumschwangerschaftsenzym korrespondieren. Es wird angenommen, daß die verschiedenen LAP-Komponenten einen verschiedenen Ursprung haben und teils in der Placenta, teils in anderen Organen synthetisiert werden. Zwei der vier LAP-Bande weisen eine große Variationsbreite auf, zeigen aber keine Abhängigkeit vom Placentagewicht, Geburtsgewicht, von der Blutgruppe und dem Rhesusfaktor.
In der vorliegenden Arbeit wurden die Aktivitäten von CAP und LAP im Serum 10 Nichtschwangerer und 75 Gravider innerhalb verschiedener Schwangerschaftsabschnitte untersucht. Gleichzeitig wurden Seren 5 Schwangerer, 5 Nichtschwangerer und 2 Placentahomogenate säulenchromatographisch fraktioniert.
Aufgabe der Arbeit war es zu prüfen, ob die Aktivität von CAP und LAP in mehreren Fraktionen vorliegt, die verschiedenen Proteinen zugeordnet werden können. Ein sich dabei ergebendes Verteilungsmuster sollte mit einem Verteilungsmuster der Aktivität der gleichen Enzyme aus Placentaextrakt verglichen werden, um dadurch eventuell Hinweise für die Herkunft der Serumaktivitäten zu finden.

B. Methodik:

1. Bestimmung der Enzymaktivitäten:

a) CAP:

Wie schon oben erwähnt, kann man die Aktivität von Oxytocinase biologisch bestimmen oder biochemisch durch chromogene Substrate nachweisen. Tuppy und Mit. (77,78) hatten als Substrat Cystin - di -β- naphthylamid angegeben. Dieser Test war allerdings sehr aufwendig und nahm eine entsprechend lange Zeit in Anspruch, so daß er keinen Eingang in Routineuntersuchungen fand. Deshalb wurde versucht, ob die von Bernt und Gergmeyer (12) angegebene Methode der LAP-Bestimmung, bei der das abgespaltene β - Naphthylamin mit Echtrot 3GL zu einem roten Farbstoff gekoppelt wird, photometrisch durchgeführt werden kann. Durch kinetische Untersuchungen erwies sich dieser Weg auch für den Nachweis der CAP-Aktivität mit Cystin - di - β - naphthylamid als Substrat gangbar (79). Durch neuere Untersuchungen von Roth (58) ist eine fluorometrische Bestimmungsmethode ausgearbeitet worden. Dabei werden die obengenannten bisher bestehenden Methoden bei vorhandener apparativer Ausrüstung an Einfachheit übertroffen.

Frisch gewonnenes Blut wurde sofort zentrifugiert und das Serum im Anschluß daran verarbeitet.
Als Substrat diente L-Cystin - di -β- naphthylamid, dessen Naphthylrest durch CAP abgespalten und durch Echtrotsalz zu einem roten Diazofarbstoff gekoppelt und spektralphotometrisch quantitativ erfaßt wurde.

Notwendige Reagenzien:

0,1 m TRA-Puffer ph 7,4 (Triäthanolaminhydrochlorid)
Cystin - di - β- naphthylamid als Substrat
0,6 m Perchlorsäure
Äthylglucolmonomethyläther
Chromogen (Echtrotsalz 3 GL)
Essigsäureäthylester

Herstellung der Lösungen:

TRA-Puffer: 4,642 g in 10 ml Aqua dest. mit 1 n NaOH auf ph 7,4 einstellen

Cystin - di - β - naphthylamid: 13,5 mg werden in 5 mg Äthylglucolmonomethyläther gelöst.

Perchlorsäure (0,6 m): 5,2 ml 70%iger Perchlorsäure werden auf 100 ml Aqua dest. aufgefüllt.

Chromogen: 20 mg Echtrotsalz 3 GL werden kurz vor dem Ansatz mit 20 ml Aqua dest. verdünnt.

Bestimmungsansatz:

Der Ansatz bestand aus einem Meß- und Leerwert. Beide enthielten:

1,9 ml Tra - Puffer
0,25 ml Substrat
0,4 ml Serum

Der Leerwert wurde sofort mit 2,5 ml 0,6 m Perchlorsäure inaktiviert. Dann wurden beide Gemische bei 37 Grad C 60 Minuten inkubiert. Die Reaktion des Meßwertes wurde anschließend ebenfalls mit 2,5 ml 0,6 m Perchlorsäure abgestoppt, und beide Ansätze wurden ca. 5 Min. bei 3000 - 4000 U/Min. zentrifugiert. Danach wurden

1 ml Überstand bzw. Leerwert
1 ml Chromogen

gemischt, 10 Min. bei Raumtemperatur stehen gelassen

und mit

5 ml Essigsäureäthylester

versetzt. Das Ganze wurde 1 Min. kräftig geschüttelt und noch einmal 5 Min. bei 3000 U/Min. zentrifugiert. Der rotgefärbte Überstand wurde in eine mit Alkohol ausgespülte Kuvette (Schichtdicke 1 cm) gegeben und bei einer Extinktion von 492 nm gegen den Leerwert im Eppendorf Photometer gemessen.

Da zwischen der eingesetzten Menge L-Cystin - di - β- naphthylamid und der ermittelten Extinktion direkte Proportionalität besteht, kann die freigewordene Menge β- Naphthylamin aus der Eichkurve ersehen werden.

Berechnung der Aktivität:

Das Testvolumen beträgt 2,55 ml. Darin sind 0,4 ml Serum enthalten. Die Umrechnung auf 1 ml Serum ergibt sich durch Division des Anfangsvolumen (AV) durch das Endvolumen (EV).

$$\frac{EV}{AV} = \frac{2,55}{0,4}$$

Bei der Enteiweißung wird der Ansatz im Verhältnis 1 : 2 verdünnt. Es ergibt sich ein Umrechnungsfaktor von

$$\frac{2,55 \times 2}{0,4} = 12,75 \text{ für 1 ml Serum}$$

1 µ Mol Cystin - di -β- naphthylamid setzt 286 µ g β- naphthylamin frei. Der aus der Eichkurve abgelesene Wert µ g β- Naphthylamin wird mit 12,75 multipliziert, danach durch 286 (Molekulargewicht von L - Cystin - di - β - naphthylamid) dividiert und ergibt so µ Mol. Anschließend wird durch 60 dividiert (Zeitfaktor bei 1 Stunde Inkubationszeit) und ergibt dann mE = µ Mol/ml/Min.

b) LAP:

Zur Aktivitätsbestimmung von LAP diente Leucin - para - nitroanilid (Leupa), ein farbloses, chromogenes Substrat, das durch LAP in Leucin und Paranitroanilin gespalten wird. Die dabei entstehende Gelbfärbung ist proportional der vorhandenen Enzymmenge, deren Extinktion spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen werden kann. Die Methodik erfolgte nach Sitzmann und Geiger in Anlehnung an Nagel und Willich (81).

Notwendige Reagenzien:

Kaliumdihydrogenphosphat $KH_2PO_4$

Dikaliumhydrogenphosphat $K_2HPO_4$

Leucin - para - Nitroanilid

Herstellung der Lösungen:

K-Phosphatpuffer (0,05 m,ph 7,2):6,81 g/l 0,05 m $KH_2PO_4$ und 8,71 g/l 0,05 m $K_2HPO_4$ wurden unter der Elektrode auf ph 7,2 eingestellt.

Leucin - p - nitoanilid 0,025 m

Bestimmungsansatz:

Der Ansatz besteht aus einem Meß- und Leerwert, die beide

3 ml Phosphatpuffer
0,1 ml Leupa

enthalten. Nach 5 min. Inkubation bei 25 Grad C wird dem Meßwert

0,1 ml Serum

zugegeben, und er wird gegen den Leerwert bei 405 nm und einer Schichtdicke von 1 cm im Eppendorf Photometer

gemessen. Nach weiterer Inkubation von 30 Minuten wurde die Extinktion erneut gemessen und die Extinktionsdifferenz gebildet.
Diese Differenz, mit 108 multipliziert, ergibt die Aktivität in mE / ml Serum.
Der Umrechnungsfaktor 108 ergibt sich nach folgender Formel:

$$IU = \frac{\Delta E/min}{\varepsilon \times d} \times \frac{EV \times 10^6}{AV}$$

E = Extinktionsdifferenz
= molarer Extinktionskoeffizient $9{,}9 \times 10^3$
EV = Endvolumen
AV = Anfangsvolumen
d = Schichtdicke

$$IU = \frac{\Delta E/30 \times 3{,}2 \times 10^6}{9{,}9 \times 10^3 \times 0{,}1}$$

$$= \Delta E \times 108$$

| Woche | CAP- Aktivität in I.E. | | LAP-Aktivität in I.E. | | LAP-/ CAP | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | $\bar{x}$ | s | $\bar{x}$ | s | $\bar{x}$ | s |
| Nicht-schwangere | 0,645 | ±0,27 | 12,66 | ±2,5 | 20,3 | ±10,1 |
| 10-14 | 0,802 | ±0,0 | 13,55 | ±4,74 | 18,8 | ±0,0 |
| 14-18 | 0,871 | ±0,251 | 19,29 | ±12,5 | 21,2 | ±7,3 |
| 18-22 | 1,716 | ±0,48 | 28,03 | ±29,08 | 13,9 | ±13,6 |
| 22-26 | 1,362 | ±0,335 | 56,07 | ±20,09 | 26,3 | ±3,1 |
| 26-30 | 3,029 | ±2,09 | 114,48 | ±69,3 | 29,04 | ±14,7 |
| 30-34 | 2,88 | ±0,74 | 93,13 | ±47,26 | 29,1 | ±5,2 |
| 34-38 | 3,5 | ±1,34 | 128,48 | ±56,56 | 30,6 | ±11,4 |
| 38-42 | 4,09 | ±1,6 | 159,87 | ±46,72 | 37,1 | ±22,02 |
| Übertragung | 8,4 | | | | | |

Tabelle 1

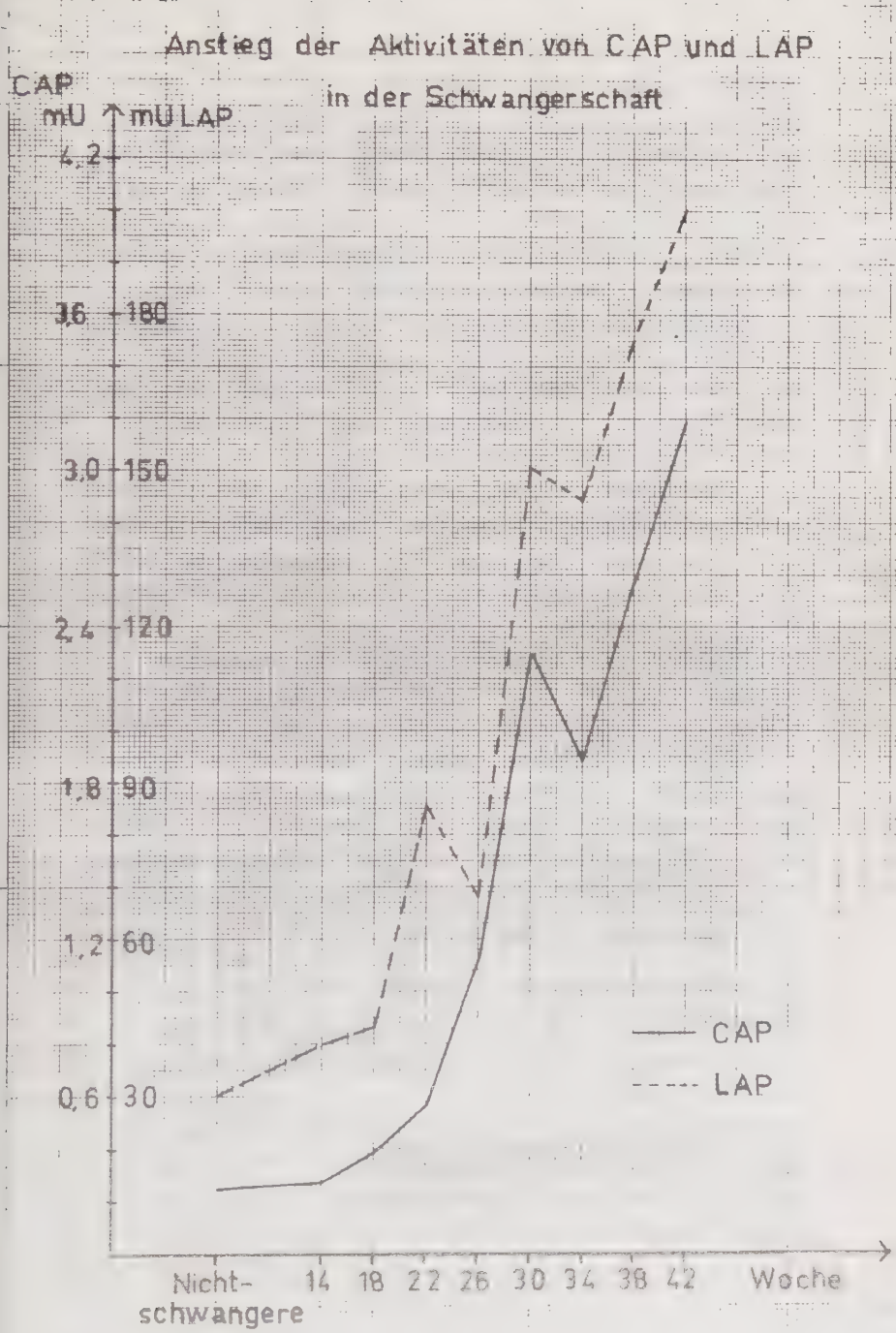

Anstieg der Aktivitäten von CAP und LAP
in der Schwangerschaft
CAP
mU
mU LAP
4,2
3,6
180
3,0
150
2,4
120
1,8
90
1,2
60
0,6
30
CAP
LAP
Nicht-
schwangere
14
18
22
26
30
34
38
42
Woche

Abb. 1

c) Ergebnisse:

Tabelle 1 und Abbildung 1 zeigen den Aktivitätsanstieg der CAP und LAP im Verlaufe der Schwangerschaft. Der niedrigste Wert bei beiden Enzymen findet sich bei Nichtschwangeren.

Die CAP zeigt einen langsamen Anstieg bis zur 18. Woche, dann einen steilen Anstieg bis zur Geburt, wo sie ihr Maximum erreicht. Allerdings ergibt die Kurve in der 22. - 26. und in der 30. - 34. Woche einen Abfall. Der höchste Wert mit 8,4 I.E. findet sich bei einer Patientin mit Übertragung und liegtdoppelt so hoch wie die Werte bei gesunden Schwangeren am Termin.

Ähnlich verhält sich der Aktivitätsverlauf der LAP. Die Werte steigen langsam bis zur 22. Woche, dann steil bis zur 30. Woche an und fallen zwischen der 30. - 34. Woche etwas ab, um erneut bis zum Geburtstermin anzusteigen.

Die Standardabweichungen zu den einzelnen Werten weisen sowohl bei der CAP als auch bei der LAP erhebliche Größenunterschiede auf. Die Aktivität von LAP erhöht sich um den etwa 13,5 fachen Wert Nichtschwangerer, während sich die Enzymaktivität von CAP nur etwa 6,5 fach steigert. Der Quotient LAP/CAP, der bei Nichtschwangeren ca. 1/20 beträgt, sinkt zum Ende der Gravidität fast um das Doppelte auf 1/40.

2. Säulenchromatographische Fraktionierung:

Frisch gewonnenes Serum 5 Schwangerer mens X und 5 Nichtschwangerer wurde säulenchromatographisch fraktioniert.

Durch Gelfiltration an Sephadex G 25 wurde das Serum von niedermolekularen Bestandteilen befreit. Die Säule wurde mit 3 ml Serum beschickt, und daraus wurden 6 ml Eluat gewonnen.

Zur weiteren Auftrennung wurden 5 ml des gewonnenen Eluats auf einen Jonenaustauscher DEAE-Sephadex A 50 gegeben. Dieser Austauscher besteht aus quervernetzten Dextranketten und eignet sich besonders zur Trennung hochmolekularer und empfindlicher Stoffe. Das Gel wurde mit dem verwandten Puffer äquilibriert und in eine 12,5 x 0,9 Chromatographiesäule gebracht. Das vorgereinigte Serum wurde durch Stufenelution fraktioniert.

Stufe 1: 40 ml 0,05722 m Tris-Puffer ph 7,2
Stufe 2: 50 ml 0,05 m NaCl
Stufe 3: 50 ml 0,1 m NaCl
Stufe 4: 40 ml 0,2 m NaCl
Stufe 5: 30 ml 0,4 m NaCl

Diese Mengen hatten sich zur deutlichen Trennung der einzelnen Gipfel in Vorversuchen am günstigsten erwiesen.
Das Eluat wurde in 5 ml Fraktionen aufgefangen (LKB Radirac Fraction Collector Typ 3402 B). Die Proteinkonzentration ergab sich durch Messung der UV-Absorption (Spektralphotometer Zeiss PQM II 2693) bei 280 m .
Die Enzymkonzentrationen von CAP und LAP wurden im Ausgangsmaterial, im vorgereinigten Serum und in den einzelnen Fraktionen bestimmt.
Zur Proteinmessung wurden Ausgangsmaterial und vorgereinigtes Serum im Verhältnis 1:100 verdünnt und der Proteingehalt nach Grimm, Doherty (25) bestimmt.

a) Bestimmung der CAP:

Notwendige Reagenzien:

0,1 m Tris-Puffer ph 7,9

0,01 m NaOH

Substrat (16,68 mg L-cystin - di - β - naphthylamid in 5 ml Äthylglycolmonomethyläther)

Bestimmungsansatz:

| 8 | Serum | Eluat | Leerwert |
|---|---|---|---|
| Serum bzw. Eluat | 2,0 ml | 0,1 ml | 8 |
| Tris-Puffer | 0,25 ml | 2,15 ml | 2,25 ml |
| Substrat | 0,25 ml | 0,25 ml | 0,25 ml |

Nach 60 Minuten Inkubation bei 37 Grad C wurden die Ansätze bei 5000 U/Min. 10 Min. zentrifugiert.

0,5 ml Überstand

wurden mit 4,5 ml 0,01 m NaOH

gemischt, nochmals 10 Min. bei 5000 U/Min. zentrifugiert und gegen eine Standardlösung β - Naphthylamin fluorometrisch gemessen (Zeiss - Spektralphotometer PMQII mit Fluoreszenszusatz ZFM4). Anregung bei 334 nm, Sekundärstrahlung bei 405 nm.

Berechnung der Aktivitäten:

Freigesetzte Menge Substrat in µg, dividiert durch 286 (Molekulargewicht von L-Cystin - di - β - Naphthylamid) ergibt µ Mol.

$$\frac{\mu \text{Mol}}{\text{min.}} \times \frac{EV}{AV} = \mu \text{Mol/ml/min.}$$

Serum: $\frac{EV}{AV} = 250$

Eluat: $\frac{EV}{AV} = 12{,}5$

b) Bestimmung der LAP:

Notwendige Reagenzien:

0,1 Tris-Puffer ph 7,2 (Tris (hydroxymethyl) aminomethan)

0,025 m Leucin-p-nitroanilid ph 7,2

Bestimmungsansatz:

| | Serum | Eluat | Leerwert |
|---|---|---|---|
| Tris-Puffer | 3 ml | 2 ml | 3 ml |
| Leupa | 0,1 ml | 0,1 ml | 0,1 ml |

Die Ansätze wurden 5 Min. bei 25 Grad C inkubiert, dann wurden

0,1 ml Serum

bzw. 1,0 ml Eluat

hinzugegeben und die Extinktion bei 405 nm gemessen. Die weitere Inkubation und Messung erfolgte wie oben angegeben.

Berechnung der Aktivität:

Die Berechnung erfolgte nach folgender Formel in internationale Einheiten:

$$IU = \frac{E/min}{X\ d} \times \frac{EV \times 10^6}{AV}$$

E = Extinktionsdifferenz

= molarer Extinktionskoeffizient 9,9 x 10,3

d = 1 (Schichtdicke)

EV = Endvolumen

AV = Anfangsvolumen

Serum: AV = 0,1 ml
EV = 3,2 ml

Eluat: AV = 1,0 ml
EV = 3,1 ml

Als Umrechnungsfaktor ergibt sich für den Serumwert 107,7 und für die einzelnen Fraktionen 10,43.

3. Placentaextrakt:

Placentagewebe wurde zerkleinert, von gröberem Bindegewebe und Eihäuten befreit, mit 0,25 m kalter Rohrzuckerlösung mehrmals gespült, durch Gaze abgegossen und auf Filterpapier getrocknet. Etwa 10 gr wurden mit 30 ml entmineralisiertem $H_2O$ kräftig homogenisiert und 45 Min. bei 32 000 U/Min.(Spinco Ultrazentrifuge) zentrifugiert. Der klare Überstand wurde abpipettiert und wie oben angegeben fraktioniert. Im Ausgangsgewebe und Eluat wurden Protein, CAP und LAP-Aktivitäten nach der gleichen Methodik wie im Serum bestimmt.

C. Ergebnisse:

1. Elutionsprofile Nichtschwangerer:

Die Abbildungen 01-05 zeigen die Elutionsprofile 5 gesunder Nichtschwangerer. Die Serumproteine wurden in 5 Fraktionen aufgetrennt, wobei die Hauptmenge in den Fraktionen I, III und IV enthalten ist, während Fraktion II und V nur kleinere Proteinpeaks zeigen. Während die einzelnen Gipfel im allgemeinen scharf getrennt sind, ist der Proteingipfel in Fraktion IV, Abb. 03 zweigipfelig.
Die Darstellungen zeigen neben dem Proteingehalt die Aktivitäten von LAP und CAP. In Abb. 03 ist die LAP nur in Fraktion IV enthalten, während sie in Abb.01 in der III. und IV. und in Abb. 02 in der I., II., III., IV., in Abb. 04 in der II., IV. und in Abb. 05 in der IV. und V. Fraktion nachweisbar ist. In den Abbildungen 01, 03, 04, 05 liegt allerdings die Hauptaktivität der LAP immer in Fraktion IV, nur in Abb.02 finden sich zwei fast gleich hohe peaks in Fraktion II und IV, während die restliche Aktivität auf die Fraktionen I und III verteilt ist (Siehe Tabelle 2 u.3).

Die Aktivität der Cystinaminopeptidase ist in Abb. 01, 02 nur in der Fraktion IV, in Abb. 03 in der II., III., IV., in Abb. 04 in der II., IV. und in Abb. 05 in der II., III. und IV. Fraktion enthalten. Dabei enthält Fraktion IV immer das Maximum der Aktivität von CAP, die in Abb. 01, 02 sogar 100% beträgt, in Abb. 04 mit ca. 80% den Hauptanteil enthält, während in Abb. 05 nur 66% darauf entfallen, und die beiden anderen Fraktionen mit je 17% beteiligt sind. In Abb. 03 ist die Enzymaktivität fast gleichmäßig auf die 3 Fraktionen verteilt (siehe Tabelle 2 und 3).

2. Elutionsprofile gesunder Schwangerer

In den Abbildungen 11 - 15 sind die Elutionsprofile von Serumproteinen, LAP- und CAP-Aktivitäten gesunder Schwangerer mens X dargestellt.

Abb. 11, 12 zeigen CAP - Aktivitäten in den Gipfeln I, II, III, IV, Abb. 13 in I, III, IV, Abb. 14 in I, II, IV und Abb. 15 in II, III, V. Die Hauptaktivität liegt bei allen 5 Schaubildern mit 82 - 98% in Fraktion IV, die übrigen 2 - 18% sind auf 2 - 3 weitere peaks verteilt.

Die Verteilung der LAP-Aktivität weist ein ähnliches Bild auf. Sie ist in Abb. 11,12 in Fraktion I, III, IV, in Abb. 13 in Fraktion I, IV, in Abb. 14 in Fraktion II - V und in Abb. 15 in Fraktion I, II - V enthalten.

Bei Schwangeren und Nichtschwangeren liegen die höchsten Aktivitäten ausnahmslos in der IV. Fraktion (siehe Tabelle 2 und 3).

3. Elutionsprofile der Placenten

In den Elutionsprofilen zweier Placenten zeigen sich 5 teilweise unterscheidbare Proteinpeaks, wobei der erste den Hauptanteil enthält und scharf von den anderen abgesetzt ist. Im Gegensatz zur Auftrennung der Seren ist die Enzymaktivität in den Placentaextrakten nicht auf einen Hauptpeak zentriert, sondern über 5 Fraktionen verteilt (Tabelle 2 und 3).

4. Immunelektrophorese

Die immunelektrophoretische Untersuchung zeigte, daß mit Fraktion I die $\gamma$ - Globuline, mit Fraktion II $\beta$ - Albumin oder Transferrin, mit III $\alpha$ - Albumin, mit IV $\alpha_1$, $\alpha_2$ ($\beta$) Albumin und mit Fraktion V ein nicht weiter zu charakterisierendes Protein wandert.

Prozentuale Verteilung der CAP-Aktivität in den einzelnen Fraktionen:

| Fraktion | Nichtschwangere | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 01 | 02 | 03 | 04 | 05 |
| I | | | | | 17,7 |
| II | | | 31,5 | 18,8 | 17,2 |
| III | | | 32,5 | | |
| IV | 100,0 | 100,0 | 35,9 | 81,1 | 66,0 |
| V | | | | | |

| Fraktion | Schwangere | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 |
| I | 1,7 | 2,9 | 1,6 | 2,9 | |
| II | 4,7 | 3,9 | | 4,4 | 4,8 |
| III | 5,2 | 10,01 | 0,5 | | 1,7 |
| IV | 88,3 | 82,8 | 97,8 | 92,6 | 92,9 |
| V | | | | | 0,6 |

| Fraktion | Placenta | |
|---|---|---|
| | 1 | 2 |
| I | | |
| II | 15,0 | 35,5 |
| III | 1,3 | 5,2 |
| IV | 68,7 | 33,02 |
| V | 15,5 | 24,2 |

Tabelle 2

Prozentuale Verteilung der LAP-Aktivität in den einzelnen Fraktionen:

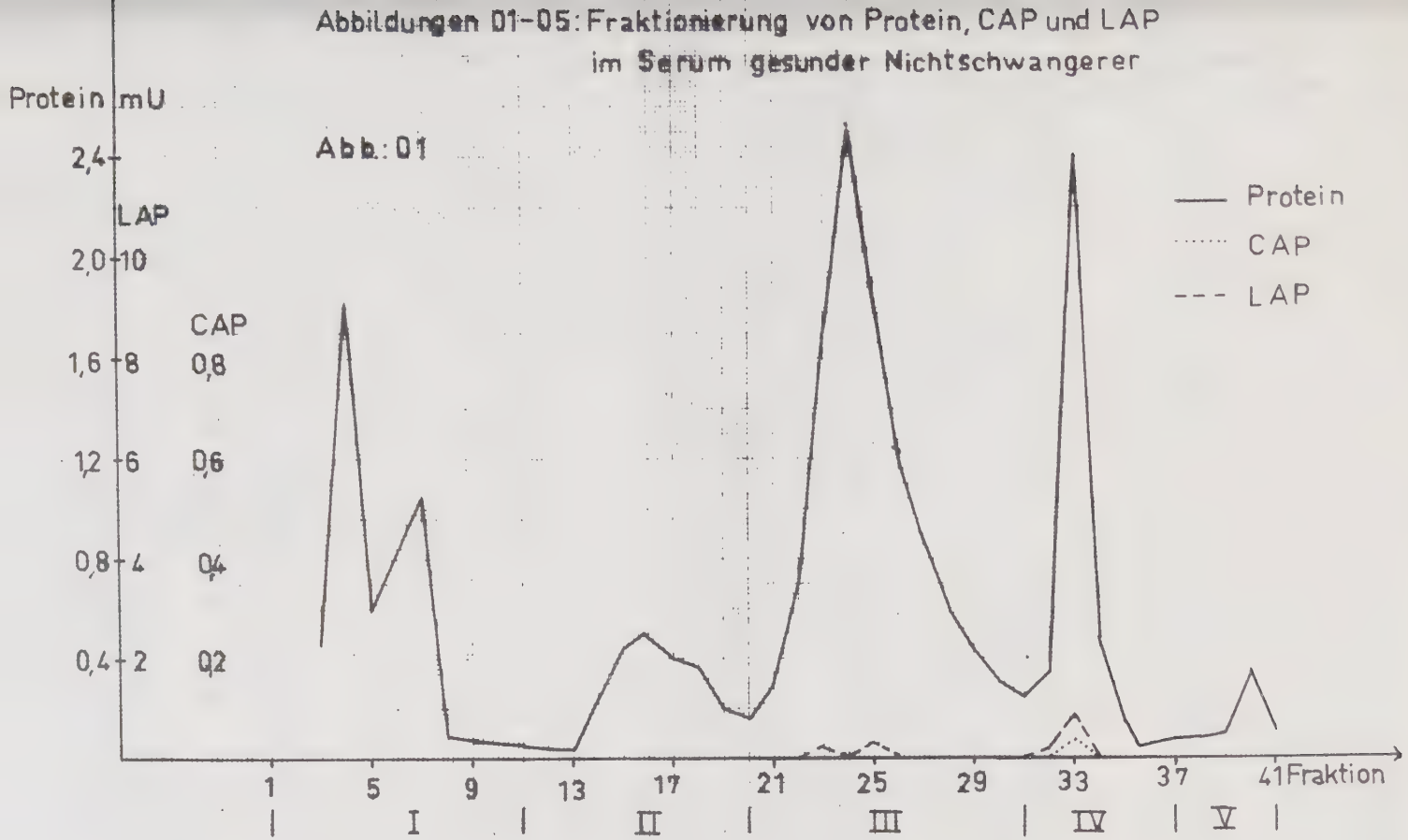
| Fraktion | Nichtschwangere | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 01 | 02 | 03 | 04 | 05 |
| I | | 2,4 | | | |
| II | | 44,2 | | 4,5 | |
| III | 23,0 | 2,6 | | | |
| IV | 76,9 | 50,8 | 100,0 | 95,4 | 87,3 |
| V | | | | | 12,7 |

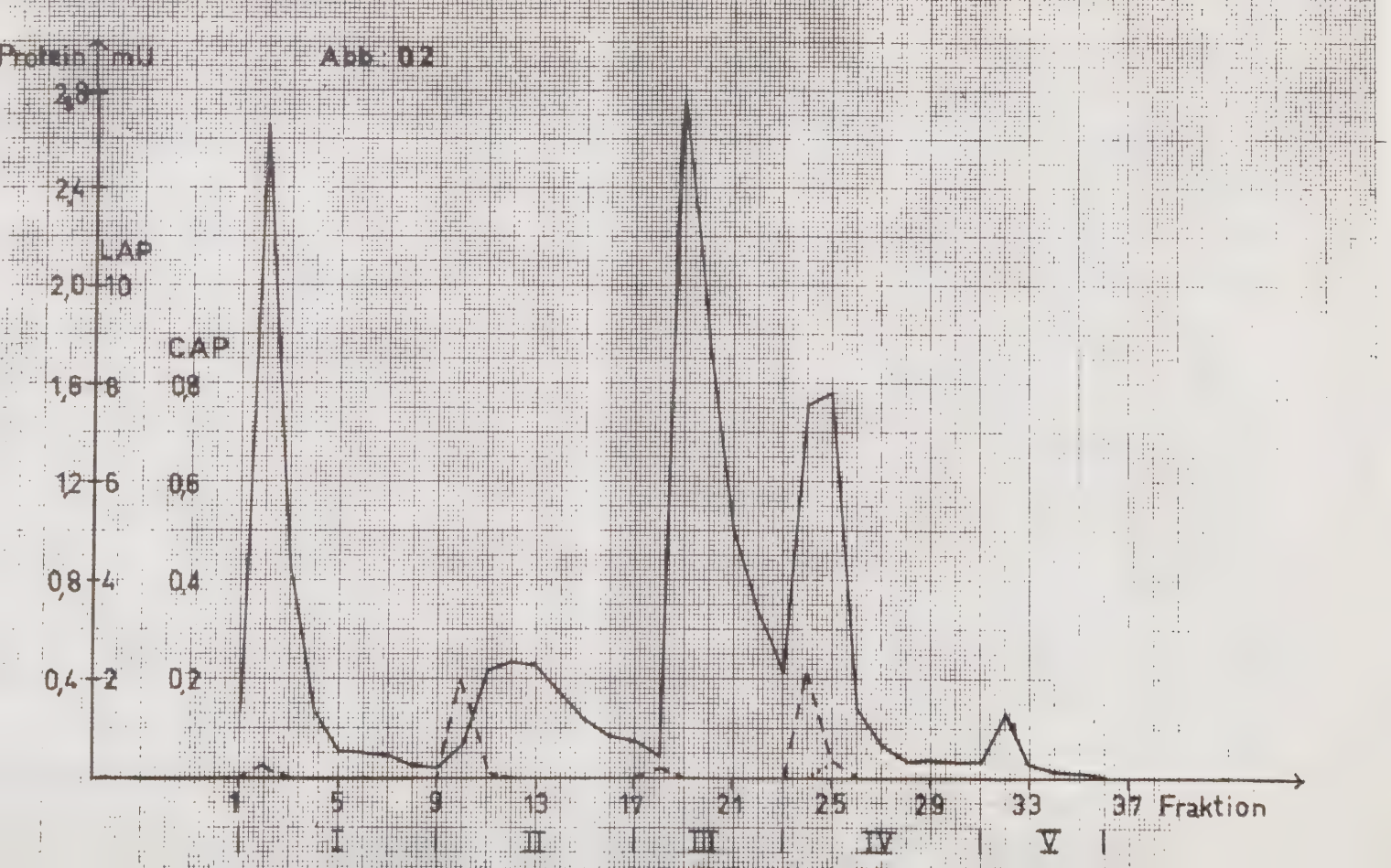
| Fraktion | Schwangere | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 |
| I | 1,06 | 1,09 | 0,55 | | 4,6 |
| II | | | | 0,71 | |
| III | 16,3 | 2,0 | | 5,9 | 3,2 |
| IV | 82,7 | 96,9 | 99,48 | 92,7 | 89,9 |
| V | | | | 0,71 | 2,2 |

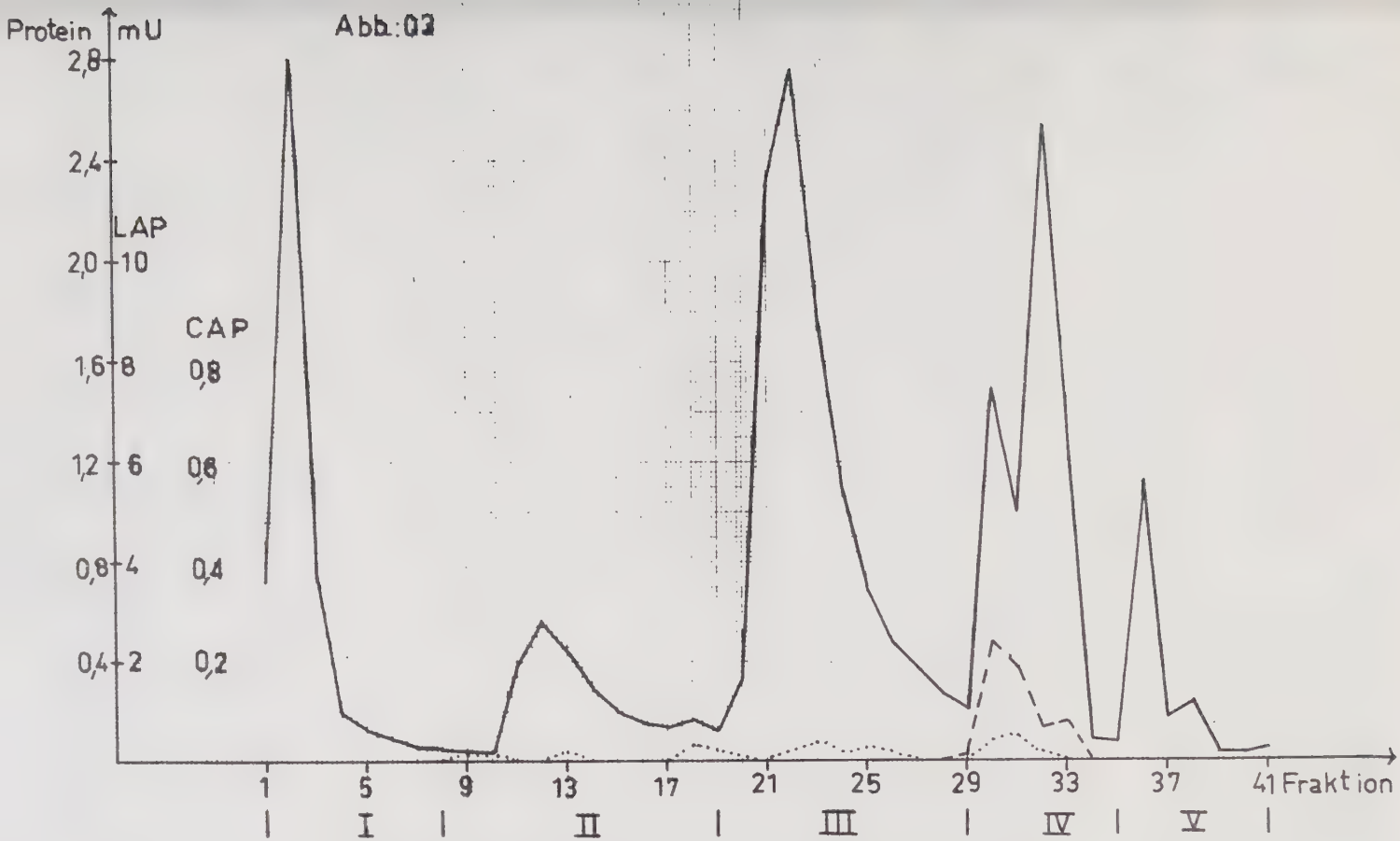
| Fraktion | Placenta | |
|---|---|---|
| | 1 | 2 |
| I | 27,8 | 4,6 |
| II | 24,4 | 14,5 |
| III | 12,7 | |
| IV | 30,4 | 51,5 |
| V | 4,4 | 29,3 |

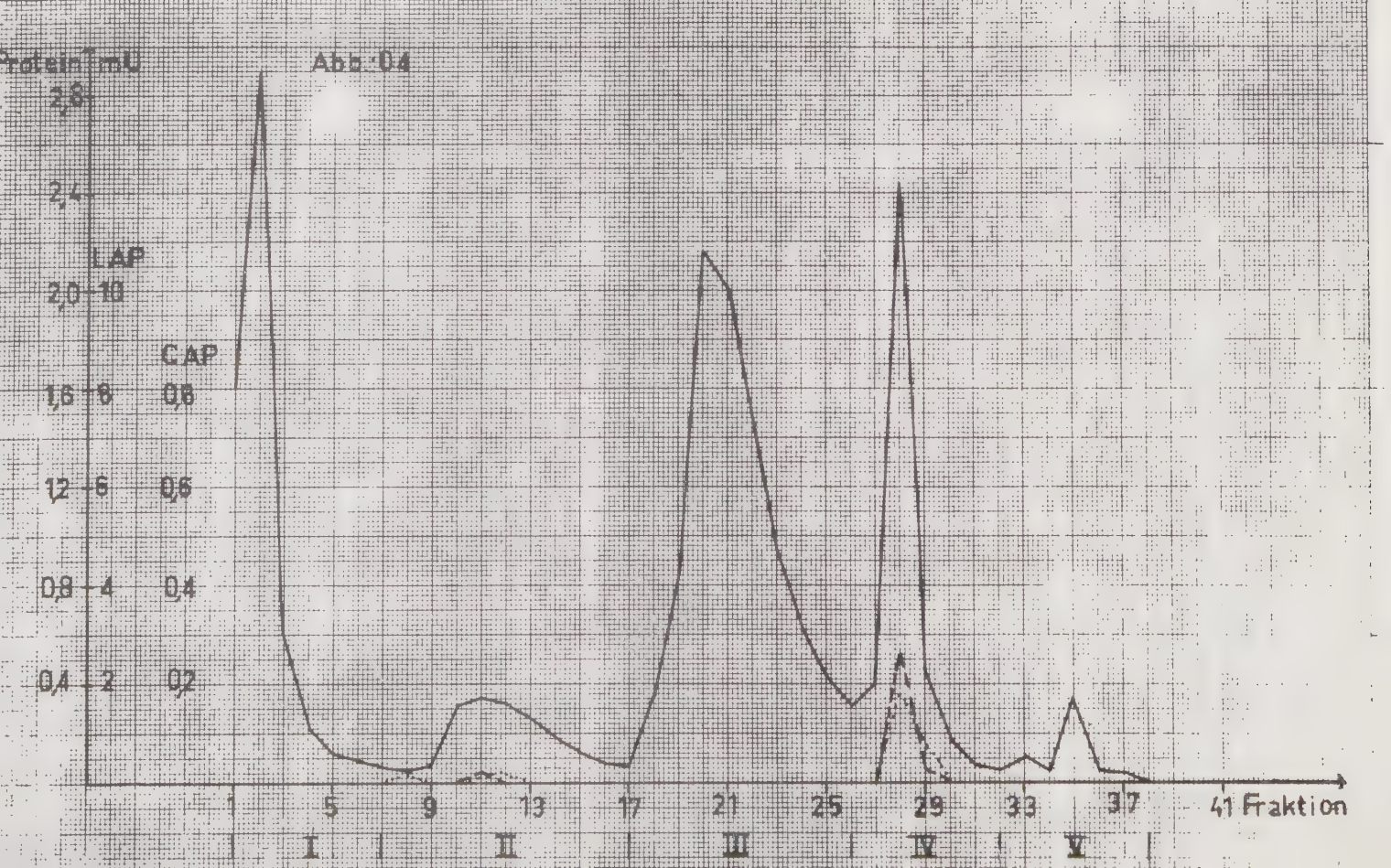
Tabelle 3

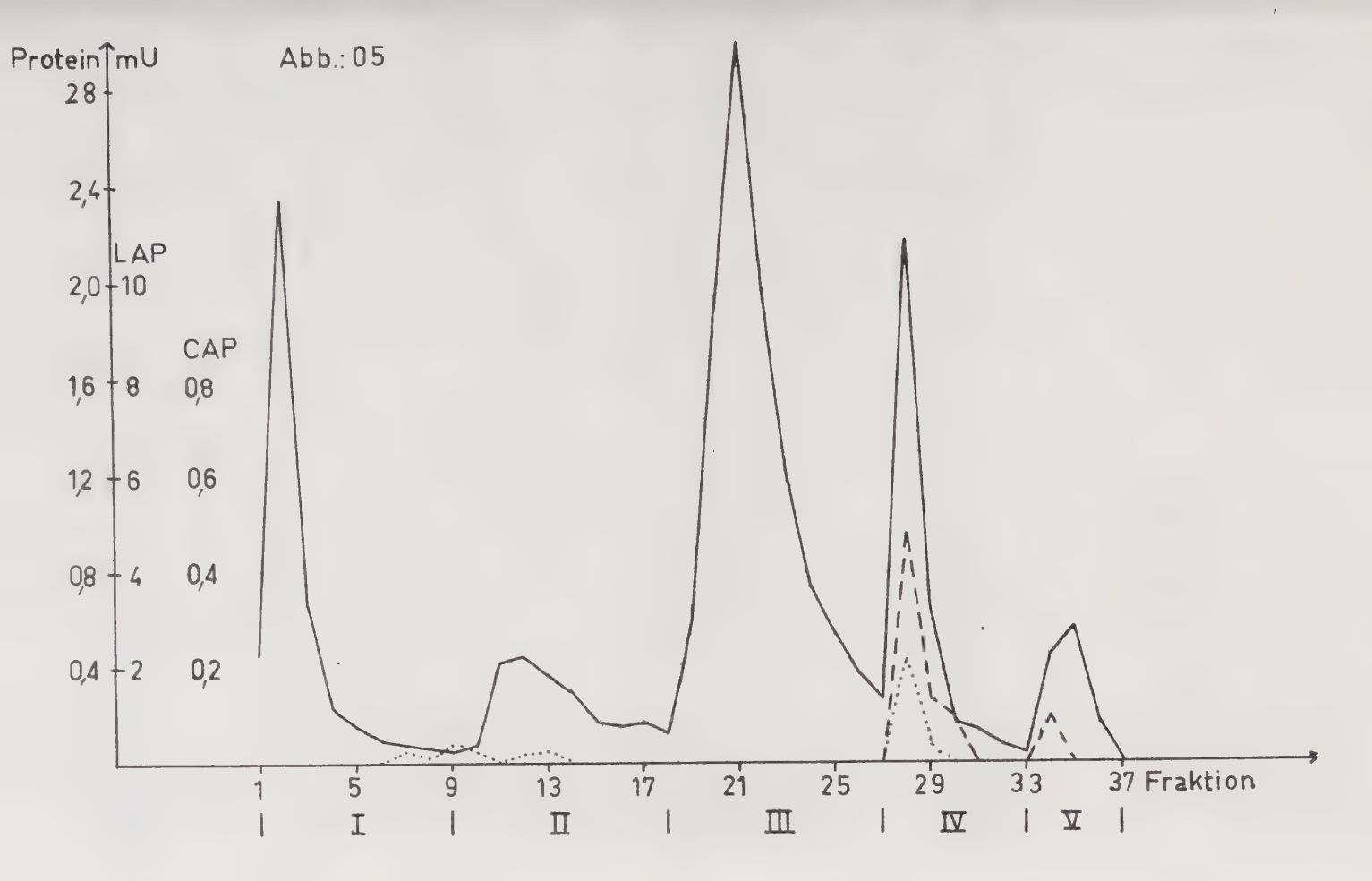
Abbildungen 01-05: Fraktionierung von Protein, CAP und LAP
im Serum gesunder Nichtschwangerer

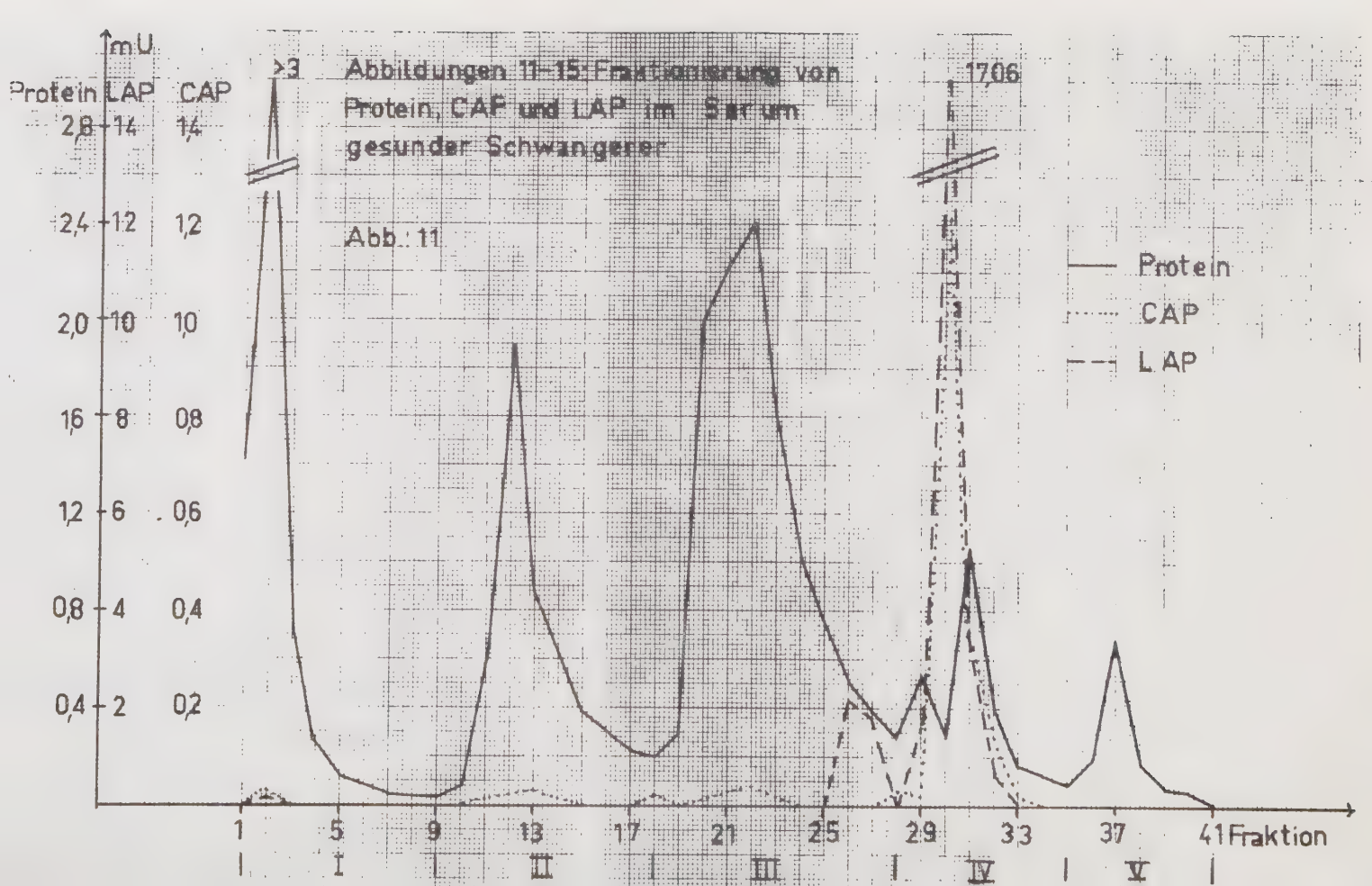



Protein mU
Abb. 02
2,8
2,4
LAP
2,0 10
CAP
1,6 8 0,8
1,2 6 0,6
0,8 4 0,4
0,4 2 0,2
1
5
9
13
17
21
25
29
33
37 Fraktion
I
II
III
IV
V


Protein
mU
Abb.: 02
2,8
2,4
LAP
2,0
10
CAP
1,6
8
0,8
1,2
6
0,6
0,8
4
0,4
0,4
2
0,2
1
5
9
13
17
21
25
29
33
37
41
Fraktion
I
II
III
IV
V


Protein mU
Abb. 04
2,8
2,4
LAP
2,0 10
CAP
1,6 8 0,8
1,2 6 0,6
0,8 4 0,4
0,4 2 0,2
1
5
9
13
17
21
25
29
33
37
41 Fraktion
I
II
III
IV
V


Protein mU
Abb.: 05
28
2,4
LAP
2,0
10
CAP
1,6
8
0,8
1,2
6
0,6
0,8
4
0,4
0,4
2
0,2
1
5
9
13
17
21
25
29
33
37 Fraktion
I
II
III
IV
V


Abbildungen 11-15: Fraktionierung von Protein, CAP und LAP im Serum gesunder Schwangerer
Abb.: 11
mU
Protein
LAP
CAP
2,8
14
1,4
2,4
12
1,2
2,0
10
1,0
1,6
8
0,8
1,2
6
0,6
0,8
4
0,4
0,4
2
0,2
>3
17,06
Protein
CAP
LAP
1
5
9
13
17
21
25
29
33
37
41
Fraktion
I
II
III
IV
V

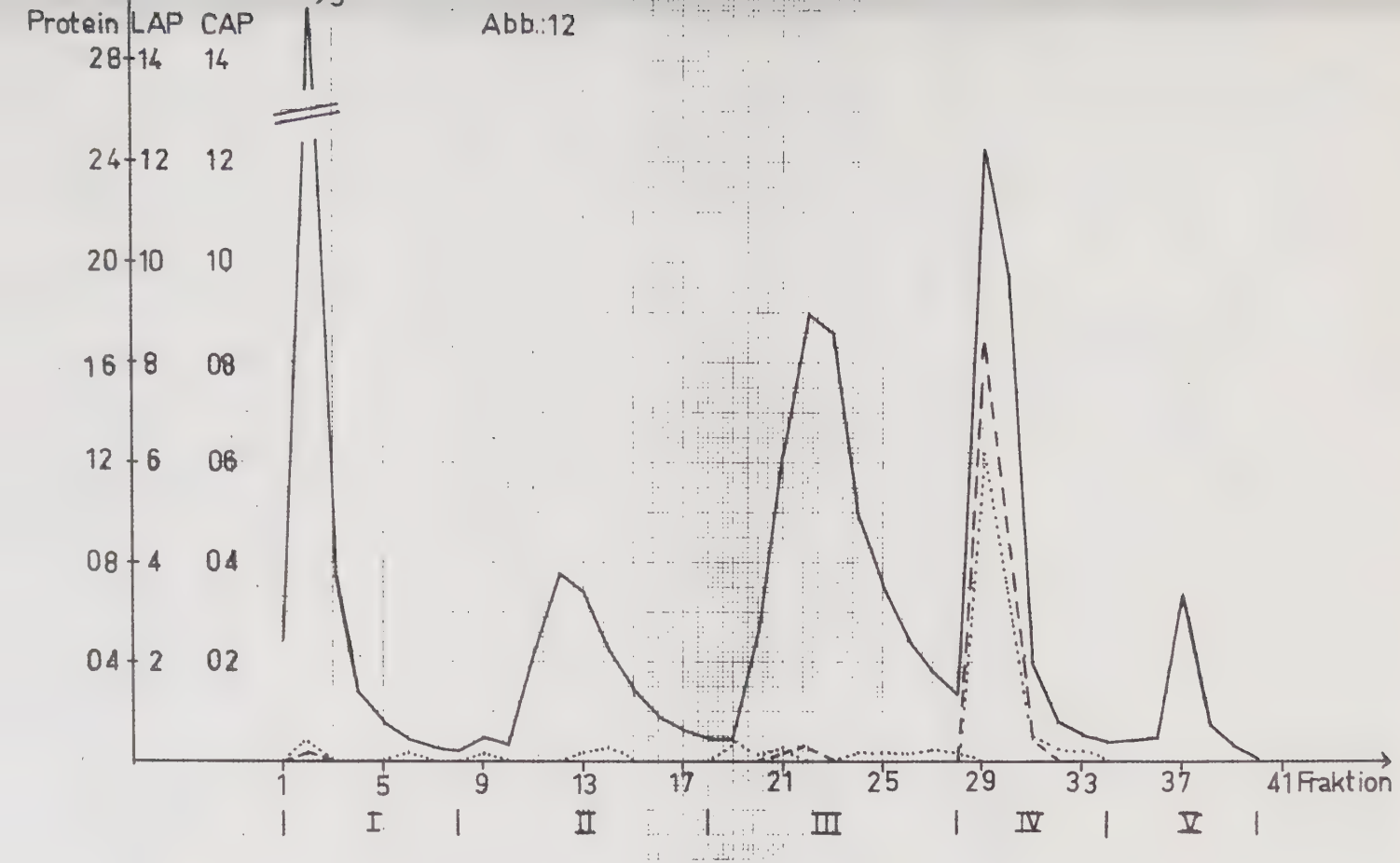
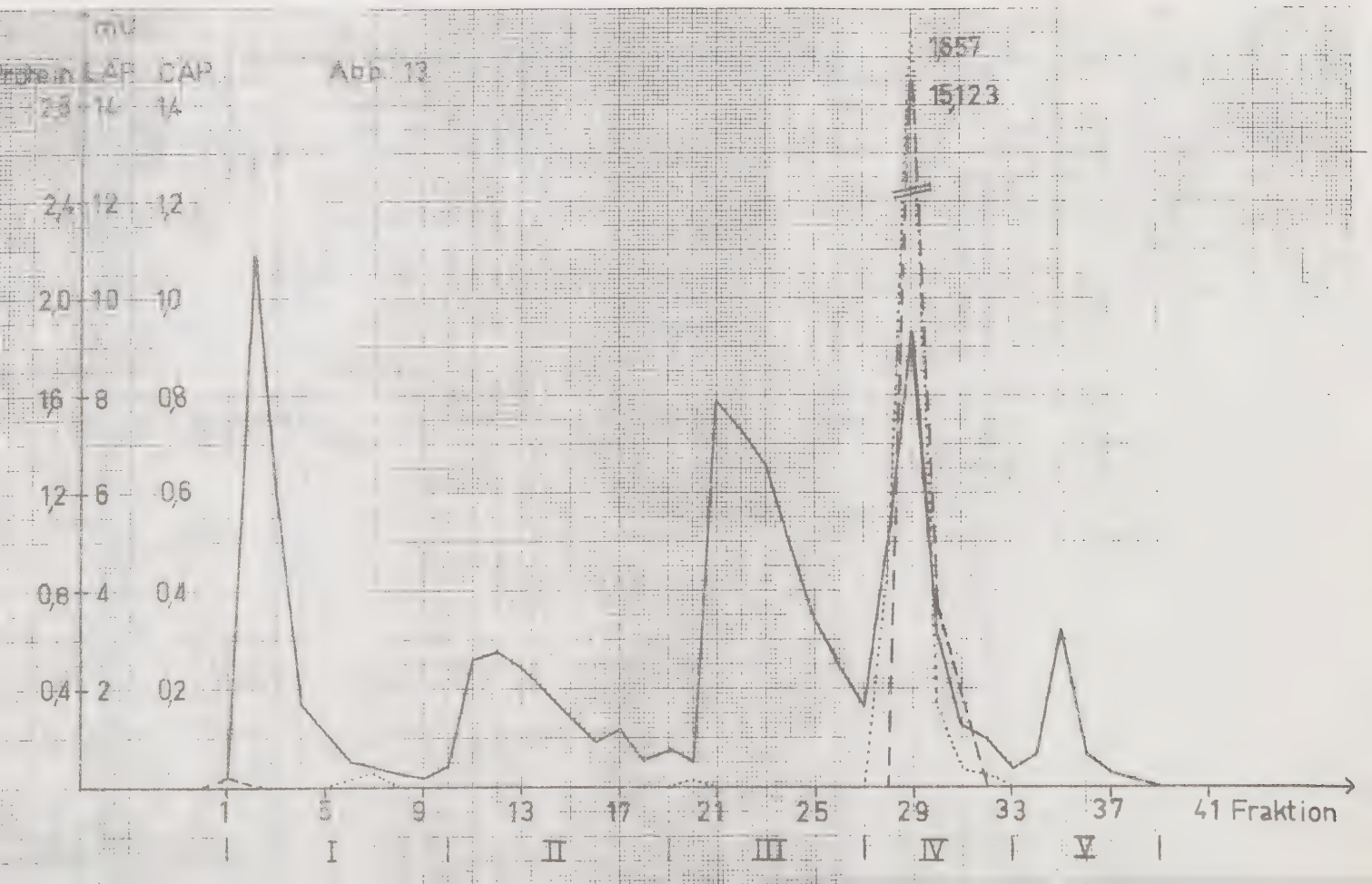
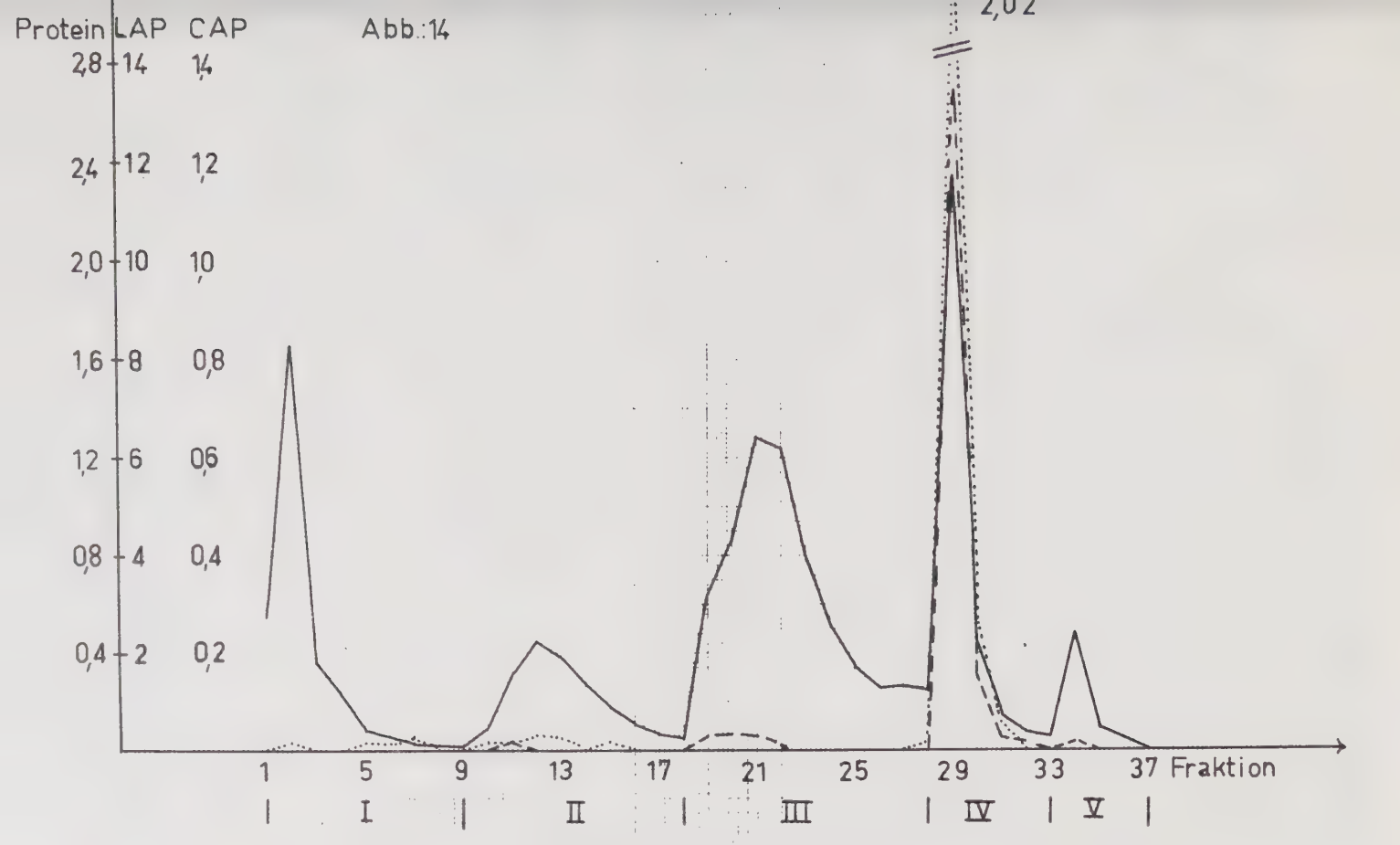
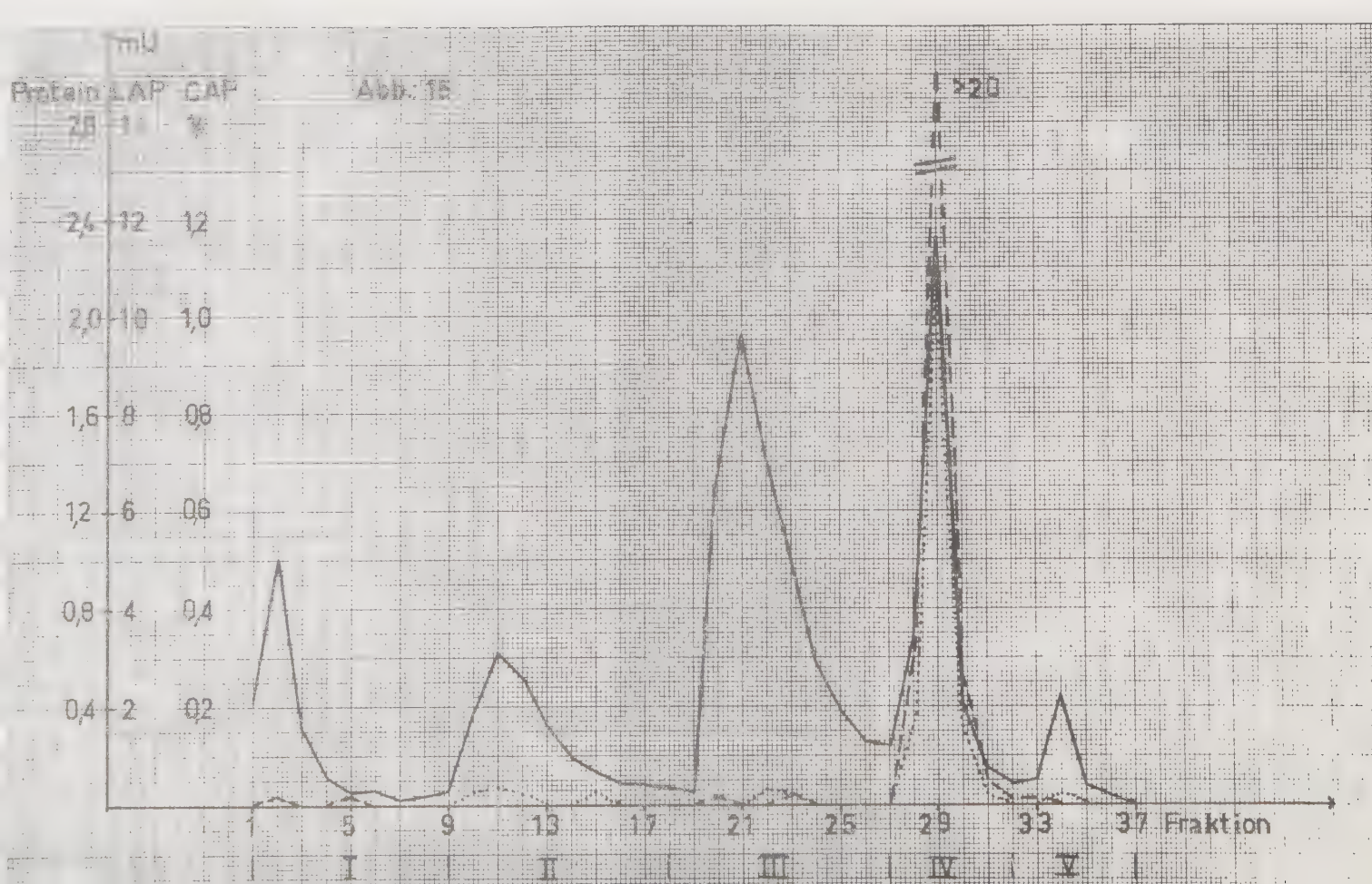

Protein
LAP
CAP
28
14
14
24
12
12
20
10
10
16
8
08
12
6
06
08
4
04
04
2
02
1
5
9
13
17
21
25
29
33
37
41
Fraktion
I
II
III
IV
V

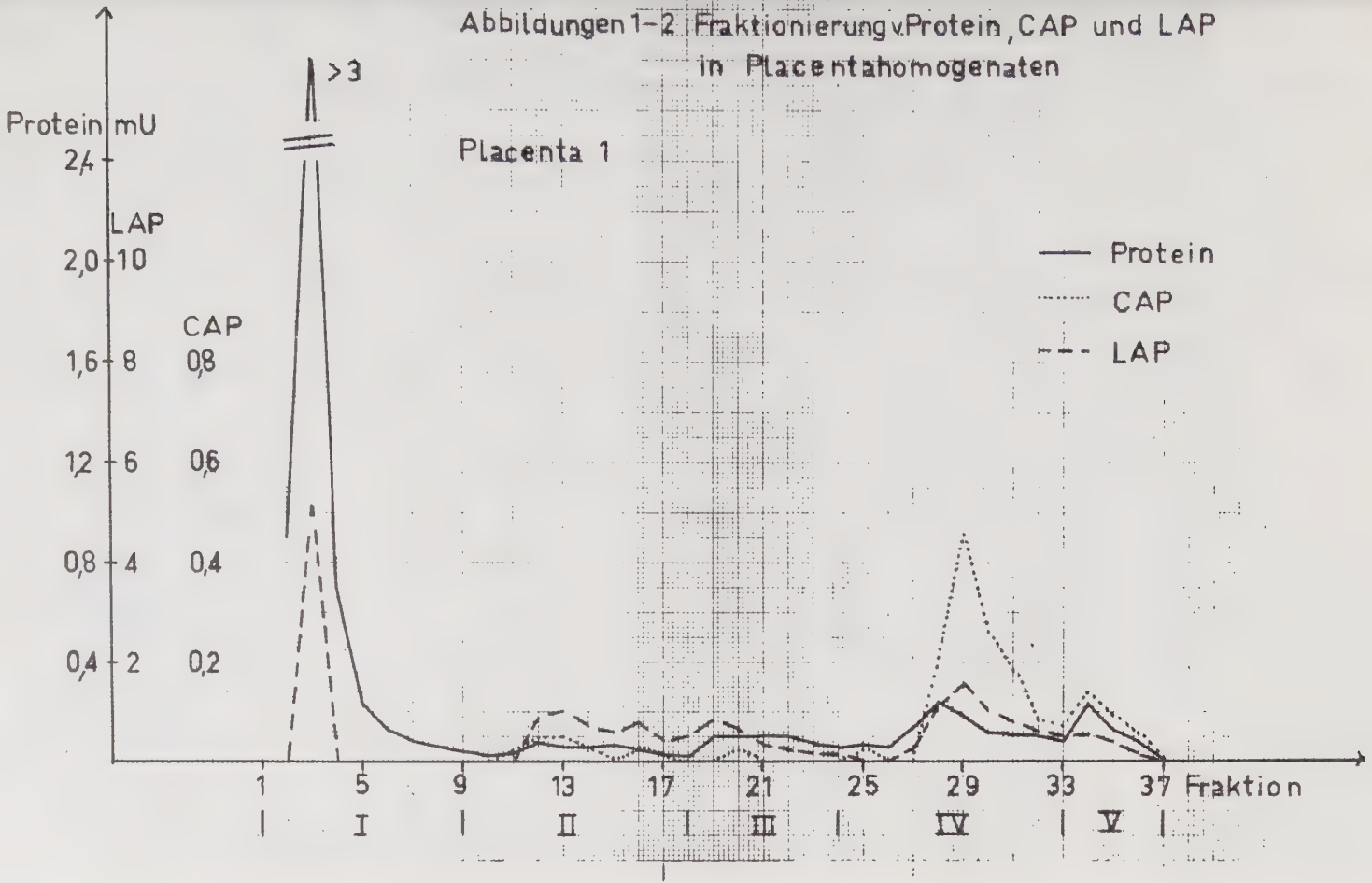
Abb.:12

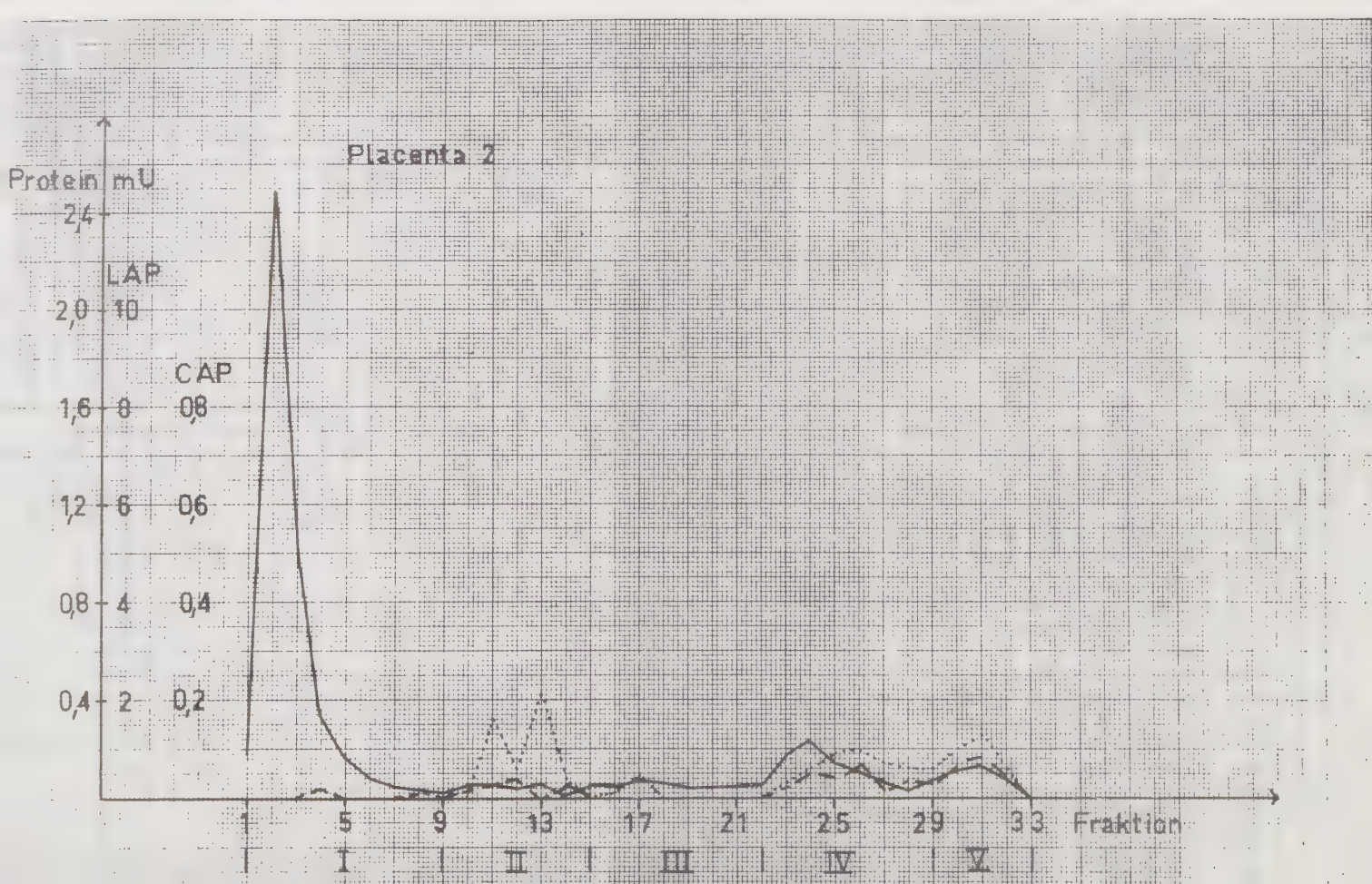

mU
Protein LAP CAP
App. 13
28 14 14
2,4 12 1,2
2,0 10 1,0
1,6 8 0,8
1,2 6 0,6
0,8 4 0,4
0,4 2 0,2
1857
15123
1 5 9 13 17 21 25 29 33 37 41 Fraktion
I
II
III
IV
V


Protein
LAP
CAP
Abb.:14
2,8
2,4
2,0
1,6
1,2
0,8
0,4
14
12
10
8
6
4
2
1,4
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
2,02
1
5
9
13
17
21
25
29
33
37
Fraktion
I
II
III
IV
V


mU
Protein
AAP
CAP
Abb. 15
28
2,4
2,0
1,6
1,2
0,8
0,4
12
10
8
6
4
2
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
>20
1
5
9
13
17
21
25
29
33
37
Fraktion
I
II
III
IV
V

Abbildungen 1–2 Fraktionierung v. Protein, CAP und LAP in Placentahomogenaten




Placenta 2
Protein mU
2,4
LAP
2,0 10
CAP
1,6 8 0,8
1,2 6 0,6
0,8 4 0,4
0,4 2 0,2
1
5
9
13
17
21
25
29
33
Fraktion
I
II
III
IV
V

## D. Diskussion:

In der vorliegenden Arbeit wurde in den Seren 75 gesunder Schwangerer und 10 Nichtschwangerer die Aktivität von CAP und LAP biochemisch bestimmt.

Die Oxytocinaseaktivität liegt am Ende der Schwangerschaft ungefähr 6,5 mal höhere als bei Nichtschwangeren. Der Enzymanstieg erfolgt erst langsam, dann steil von der 14. - 18. Woche an bis zum Termin. In der 26. und 34. Woche ist eine Aktivitätsabnahme zu beobachten, die aber durch die geringe Zahl der Patientinnen in diesen Zeiträumen vorgetäuscht sein kann. Analog der Aktivitätszunahme beobachteten Babuna und Yenen (3), Semm (65) eine steile Enzymzunahme ab der 16. Woche, während Werle und Effkemann (81) einen kontinuierlichen Anstieg angeben.
Die in der Schwangerschaft nachgewiesene Enzymaktivitätszunahme ist niedriger als von anderen Autoren angegeben wird, die auch auf Grund biochemischer Messungen zu unterschiedlichen Ergebnissen gekommen sind. So gibt Titus (76) einen 25 fachen, Ryden (59), Müller-Hartburg (47) und Klimek (34) einen 18 fachen und Tuppy und Nesvadba (77) einen 13 fachen Anstieg an.
Die LAP-Aktivität fand sich bei unseren Untersuchungen ungefähr 12,5 fach gegenüber dem Normwert Nichtschwangerer erhöht. Auch hier zeigt sich anfangs ein langsamer, von der 22. Woche an ein steiler Anstieg bis zur Geburt mit einem Absinken in der 34. Woche. Die im Serum gefundenen Enzymaktivitäten liegen etwa im Bereich der auch von anderen Autoren gemachten Angaben. Die in der Literatur bekannten Werte liegen ohnehin in einem großen Streubereich. Kokot, Cékanski (36) berichten über einen 2,5 fachen, Zsolnai und

Mit. (86) über einen 6 - 7 fachen, und Rimbach, Schreiner (55) über einen 15,3 fachen Enzymanstieg.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde das Serum 5 Schwangerer und 5 Nichtschwangerer sowie zwei Placentaextrakte säulenchromatographisch aufgetrennt. Nachdem das Serum bzw. Placentahomogenat durch Gelfiltration an Sephadex G 25 vorgereinigt war, wurde es auf DEAE - Sephadex A 50 mit steigender NaCl Konzentration stufenweise eluiert. Dabei ergaben sich 5 Fraktionen immunologisch unterscheidbarer Proteine, in denen die Aktivität von LAP und CAP bestimmt wurde. Die Cystinaminopeptidase findet sich bei Nichtschwangeren größtenteils in der IV. Fraktion, in der $\alpha_1$- $\alpha_2$ Globuline enthalten sind. Nur in Abb. 03 sind die Aktivitäten fast gleichmäßig auf die Fraktionen II - IV verteilt. Ein ähnliches Bild ergibt sich bei Schwangeren. Wenn auch hierbei die Absolutwerte höher liegen, zeigt sich dieselbe Verteilung. Die höchste Aktivität ist in Fraktion IV zu finden. Nur ein geringer Prozentsatz ist in den Fraktionen I - III enthalten.

Auch bei den Placentahomogenaten läßt sich ein großer Teil der Enzymkonzentrationen in der IV. Fraktion nachweisen; doch ist in dem Extrakt die Aktivität stärker als im Serum auf die übrigen Fraktionen verteilt. Diese Untersuchungen ergeben ein mit anderen Autoren wenig übereinstimmendes Bild. In der Schwangerschaft fanden Page und Mit. (51) zwei neu hinzukommende Bande $CAP_1$ und $CAP_2$. Auch Robinson, London, Pierce (57) konnten elektrophoretisch zwei schwangerschaftsspezifische CAP identifizieren, während Wintersberger und Tuppy (85) eine neuauftretende Bande nachwiesen, die am Ende der Gravidität die erste, auch bei Nichtschwangeren vorkommende Bande, an Intensität übertrifft.

Ähnlich wie die Oxytocinaseaktivität verteilt sich die LAP - Aktivität auf die verschiedenen Fraktionen. Einheitlich bei Schwangeren und Nichtschwangeren liegt das Aktivitätsmaximum in der IV. Fraktion. Nur ein kleiner Prozentsatz entfällt - unterschiedlich bei den einzelnen Patientinnen - auf die restlichen Fraktionen.

Im Gegensatz dazu ist die LAP - Aktivität der Placentahomogenate in Placenta 1 auf alle fünf Fraktionen und in Placenta 2 auf die Fraktionen I, II, IV und V verteilt.
Goebelsmann und Beller (22) geben einen gemeinsamen LAP - peak bei Schwangeren und Nichtschwangeren an, während ein zweiter Gipfel nur in der Gravidität nachweisbar ist. Ebenso haben Meade, Rosalki (43) und Smith, Pineda, Rutenberg (75) eine aktive Bande im $\alpha_1$- Bereich gefunden und eine schwangerschaftsspezifische Bande, die im Serum und bei Placentaextrakten im $\alpha_2$- Globulinbereich auftritt.
Durch Säulenchromatographie trennten Behal und Mit. (6) vier LAP - Fraktionen auf, während Beckman, Kanavage, Hamilton (4) elektrophoretisch im Serum Nichtschwangerer eine Bande und im Serum Schwangerer eine zweite LAP - Bande nachwiesen.
Es fällt bei unseren Untersuchungen auf, daß sowohl bei LAP als auch bei CAP das Aktivitätsmaximum im gleichen Proteingipfel lokalisiert ist. Ohne Zweifel sind die Substratspezifitäten der beiden Aminopeptidasen gering und überlappen einander.
In dieser Arbeit wurde nicht eindeutig ein in der Schwangerschaft zusätzlicher Aktivitätsgipfel gefunden, bei dem die Aktivitäten beider Enzyme divergieren. Auffallend ist auch, daß das Muster der Placenta deutlich abweicht von dem des Serums, obwohl die gleiche

Methodik angewandt wurde. Zwar findet sich genau wie im Serum auch in Fraktion IV eine deutliche Enzymaktivität, die sich aber stärker als im Serum auf die übrigen Fraktionen verteilt. Durch diese Ergebnisse wird die Möglichkeit, aus dem Verteilungsmuster der Gesamtaktivität von CAP und LAP im Serum Schwangerer Rückschlüsse zu ziehen auf die Aktivitäten beider Enzyme in der Placenta, in Frage gestellt. Ob das Verteilungsmuster der Enzyme im Serum als Parameter für die Placentafunktion gilt, läßt sich durch diese Arbeit nicht eindeutig abklären.

## E. Zusammenfassung:

Einleitend wurden die beiden Enzyme CAP und LAP charakterisiert. Anhand der Literatur wurde ihre Bedeutung in der physiologischen und pathologischen Schwangerschaft kurz skizziert. Dabei wurde auf elektrophoretische und säulenchromatographische Untersuchungen in Serum und Placentaextrakt hingewiesen.
Im ersten Teil der Arbeit wurde mit einem gegenüber früher bekannten Methoden vereinfachten colorimetrischen Nachweis die Enzymaktivität von CAP und LAP im Serum 75 Schwangerer und 10 Nichtschwangerer übereinstimmend mit anderen Autoren dargestellt. Im zweiten Teil wurden Seren 5 Gravider und 5 Nichtgravider sowie zwei Placentaextrakte säulenchromatographisch aufgetrennt in 5 Proteinfraktionen. Die Enzymaktivität sowohl bei der CAP als auch bei der LAP lag zum größten Teil in der IV. Fraktion, während sich die Aktivität der Placentahomogenate, wenn auch quantitativ unterschiedlich, auf mehrere Fraktionen verteilte.
Es ergab sich also ein von anderen Autoren abweichendes Bild, da nur eine Erhöhung der Enzymkonzentration,

keine in der Gravidität neuauftretende Bande, gefunden wurde. Da die Verteilung der Enzymaktivitäten im Serum nicht der der Placenta gleicht, sind aus den Serumwerten keine Rückschlüsse auf die Placentafunktion möglich.

F. Literaturverzeichnis:

1. Afonso, de Alvarez: Further studies gel fractionation of new zones in pregnancy. Am. J. Obstet. Gynec. 86, 815-819 (1963).

2. Babuna C., Yenen E.: Further studies on serum oxytocinase in pathologic pregnancy. Am.J. Obstet. Gynec. 94, 868-875 (1966).

3. Babuna C, Yenen E.: Enzymatic determination of placental function. Am.J. Obstet. Gynec. 7, 925-934 (1966).

4. Beckmann L.,Grivea M.: Variations in serum leucine aminopeptidase in pregnant women and newborn children. Acta paediat. scand. 54, 578-580 (1965).

5. Beckman L., Björling G., Christodoulou:H.: Pregnancy enzymes and placental poly - morphism: II. Leucine aminopeptidase. Acta genet. et stat. med. 16, 122-131 (1966).

6. Behal F.J., Kanavage Ch.,B., Hamilton, R.D.: Separation of leucyl - aminopeptidase components in normal human serum by DEAE - cellulose column chromatography. Proc. Soc. exp. Biol.(N.Y.) 109, 411-412 (1962).

7. Beller F.K., Goebelsmann U.: Der Abbau von natürlichem und synthetischem Oxytocin durch Oxytocinase. Klin. Wschr. 36, 1005-1013 (1958).

8. Beller F.K., Goebelsmann U.: Methodische Probleme der Serumoxytocinase - Bestimmung im Schwangerenserum. Acta endocr. 31, 467-480 (1959).

9. Beránkova Z., Rychlik I., Sörm F.: Encymatic inactivation of oxytocin. II. Fission of some peptide fragments of the oxytocin structure and their derivates by pregnancy serum and liver cell sap. Coll. Czech. chem. Commun. 26, 1708-1715 (1961).

10. Bernhard J.: Die Serum - Oxytocinase - Aktivität im Blut und in der Placenta am Ende der Tragzeit. Zbl. f. Gynäk. 82,785-788 (1967).

11. Bernhard J., Semm K.: Serum - L - Cystin - Aminopeptidase - Aktivität und Schwangerschaftsgestosen. Zbl. f. Gynäk. 86, 1691-1693 (1964).

12. Bernt E, Bergmeyer H.U.: Colorimetrische Bestimmung der Leucinaminopeptidase im Serum. Verfahren nach E. Bernt und H.U. Bergmeyer in "Methoden der enzymatischen Analyse" von H.U. Bergmeyer, Seite 833-835, Verlag Chemie GmbH, Weinheim/Bergstr. (1962).

13. Bryce G.F., Rabin B.R.: The function of the metal ion in leucine aminopeptidase and the mechanism of action of the enzyme. Biochem. J. 90, 513-518 (1964).

14. Carol W., Bonow A.: Die Bedeutung der Serumenzymdiagnostik für Geburtshilfe und Gynäkologie. Zbl. Gynäk. 87, 426-441 (1965).

15. Centaro A., Periti P., de Laurentiis G.: Ossitocinemia e attività psitocinasidematica e miometriole nella donna in travaglio di parto. Riv. Ostet. Ginec. 16, 297-326 (1961).

16. Concustell-Bas E., Villar-Palasi V.: Localizacion de enzimas en las frqcciones proteinicas de la sangre. I. Leucinaaminopeptidasi. Rev. exp. Fisiol. 18, 151-155 (1962).

17. v. Fekete K.: Zur Physiologie der Gravidität. Endocrin. 7, 364-369 (1930).

18. Fleisher G.A., Pankow M., Warmka C.: Leucine aminopeptidase in human serum: Comparison of hydrolysis of L - leucyl - glycine and L - leucyl - - naphthylamide. Clin. chim. Acta (Amst.) 9, 259-268 (1964).

19. Franceschelli A., Leone U.: La cistino - aminopeptidasi (ossitocinasi) nelle gravidanza oltre il termine. Monit. ostet. ginec. N.S. 35, 82-87 (1964).

20. Fylling, P.: Serum and plasma oxytocinase activity during induction of labour. Acta obstet. gynec. scand. 42, 227-239 (1963).

21. Glendening M.B., Titus M.A., Schroeder S.A., Mohun G., Page E.W.: The destruction of oxytocin and vasopressin by the aminopeptidases in sera from pregnant women. Am.J. Obstet. Gynec. 92, 814-819 (1965).

22. Goebelsmann U., Beller F.K.: Separation of Cystine - Amino - Peptidase and Leucine - Amino - Peptidase and their determination in pregnant and nonpregnant women. Zeitschr. klin. Chem. 3 49-53 (1965).

23. Göggel K.H., Creutfeld W., Murneas J.:
Das Verhalten der Leucin - Aminopeptidase und anderer Enzyme im Serum bei Leber-, Gallen- und Pancreaserkrankungen. Dtsch. med. Wschr. 85, 1756-1762, 1808-1816 (1960).

24. Goldbarg J.A., Pineda E.P., Rutenberg M.A.:
The measurement of activity of leucine-aminopeptidase in serum, urine, bile, and tissues. Am. J. clin. Pathol. 32, 571-575 (1959).

25. Grimm F.C., Doherty D.G.: Properties of the forms of malic dehydrogenase from beef heart. J.Biol.Chem. 236, 1980-1985 (1961).

26. Hanson H.: Peptidasen (Exopeptidasen) in Hoppe - Seyler - Thierfelder: Handbuch der Physiologischen- und Pathologisch - chemischen Analyse. Band IV/c, Seite 291, 155. Springer - Verlage Berlin, Heidelberg, New York 1966.

27. Ichaliotis S.D., Lambrinopoulos Th.C.:
Praeeklampsie associated with decrease in serum-oxytocinase. Obstet. and Gynec. 24, 659-661 (1964).

28. Ichaliotis S.D., Lambrinopoulos Th.C.:
Serum oxytocinase in twin pregnancy. Obstet. and Gynec. 25, 270-272 (1965).

29. Jonek J., Skalba H., Klimkiewicz Z., Dziecincnowwicz L.: Das Verhalten der LAP in verschiedenen Entwicklungsstadien der menschlichen Placenta. Zbl. Gynäk. 87, 514-520 (1965).

30. Klaus D.: Über Aminopeptidasen im menschlichen Organismus II. Diagnostische Möglichkeiten mittels AP-Bestimmung in

Körperflüssigkeiten und Formelementen des Blutes. Ärztl. Forsch. 16, 9-17 (1962).

31. Klaus D.: Über Aminopeptidasen im menschlichen Organismus. III. Herkunft und Elimination der Serum-LAP. Ärztl.Forsch. 16, 18-23 (1962).

32. Kleiner H., Graff J.: Leucine aminopeptidase et grossese. Bull. Soc. roy. belge.Gynec. ostét. N.S.31, 279-283 (1961).

33. Kleiner H.,Graff G., van Rymenaut M., Rosa P.: Activité leucine - aminopeptidasique dans des grossesses pathologique. Gynec. et obstét. 62, 47-52 (1963).

34. Klimek R.: Clinical studies on the balance between isooxytocinase in the blood of pregnant women. Clin. chim. Acta 20, 233-238 (1968).

35. Klimek R., Pietrycka M.: Biochemische Methode zur Bestimmung der Oxytocinase und ihre klinische Bewertung. Clin. chim. Acta 6, 326-330 (1961).

36. Kokot D., cekański A.: Über das Verhalten der - Glutamyl - Transpeptidasen und Leucylaminopeptidasen in Geburtshilfefällen. Zbl. Gynäk. 85, 1638-1643 (1963).

37. Kowlessar O.D, Haeffner L.J., Sleisenger M.H.: Localization of leucine aminopeptidase in serum and body fluids by starch gel electrophoresis. J.clin.Invest.39, 671-675 (1960).

38. Lambrinopoulos Th., Prolonged pregnancy associated with increase in serum oxytocinase. Obstet. and Gynec. 23, 780-782 (1964).

39. Lambrinopoulos Th., Ichaliotis S., Vambolis N.: Serumoxytocinase bei Schwangerschaftsübertragung und Praeeklampsie. Geburtsh. und Frauenheilk. 26, 534-536 (1966).

40. Lewis J.: Serum leucine aminopeptidase values in patients with trophoblastic tumors and in normal pregnancy. Am. J. Obstet. Gynec. 84, 1407-1411 (1962).

41. Linderstrøm-Lang K.U.: Über Darmerepsin. Hoppe-Seyler's physiol. Chem. 182, 151-174 (1929).

42. Lorentz K.: Untersuchungen von Enzymaktivitäten in der Blasengalle. Klin. Wschr. 41, 18-21 (1963).

43. Meade R.W., Rosalki S.B.: Localization of leucine aminopeptidase isoenzymes. J. clin. Path. 17, 61-63 (1964).

44. Melander S.: Plasma Oxytocinase Activity - A methodological and clinical study with special reference to pregnancy. Acta endocr. (Kbh.) 48, Suppl. 98 (1965).

45. Messina A., Cisternino A.: L' ossitocinasi sierica nella perdistensione uterina. (Gravidanza genellare, poliamnios, macrosomia fetale). Clin. ginec. (Catania) 7, 350-355 (1965).

46. Miller Z.B., Naor E., Milkovich L., Schmidt W.: Serum levels of cystine aminopeptidase, leucine aminopeptidase and alkaline phosphatase in single and twin pregnancies. Obstet. and Gynec. 24, 707-715 (1964).

47. Müller-Hartburg W., Nesvadba H., Tuppy H.: Die Anwendung einer chemischen Methode zur Bestimmung des Oxytocinasespiegels

in Schwangerenseren. Arch. Gynäk. 191, 442-456 (1959).

48. Müller T., Neumayr A., Pietschmann H.: Die klinische Bedeutung der LAP-Bestimmung im Serum. Wiener kl. Wschr. 74, 321-324 (1962).

49. Nicolle V., Cimellazo M.: Sul comportamento dell' ossitocinasi serica durante la gravidanza, il parto ed il puerperio. Quad. Clin. ostet. ginec. 17, 709-714 (1962).

50. Page W.E.: The value of plasmapitocinase determinations in obstetrics. Am. J. Obstet. Gynek. 52, 1014-1021 (1946).

51. Page E.W., Titus M.A., Mohun G., Glendening M.B.: The origin and distribution of oxytocinase. Am J. Obstet. Gynec. 82, 1090-1095 (1961).

52. Rettenbach - Däubner H., Rieder H.: Zur diagnostischen Bedeutung der LAP. Wien. kl. Wschr. 76, 344-346 (1964).

53. Riad A.M.: Studies on the enzymatic degradation of oxytocin and Vasopressin by human pregnancy sera. Acta endocr. 54, 618-628 (1967).

54. Riad A.M., Scandreff F.J.: Distribution of cystine aminopeptidase activity (oxytocinase) in human pregnancy sera. Nature (London) 193, 372-373 (1962).

55. Rimbach E., Schreiner R.: LAP im Blutserum während der Gestation. Med. Welt. 51, 3118-3121 (1967).

56. Rittner Chr.: Über den immunbiologischen Nachweis von Aminopeptidasen insbesondere der Oxytocinase (CAP). Z.f. Immunitätsforschg., Allergie und klin. Immunologie 131, 422-433 (1966).

57. Robinson J.C., London U.T., Pierce J.E.: Observations on the origin of pregnancy associated plasma proteins. Am. J. Obstet. Gynec. 96, 226-230 (1966).

58. Roth M.: Fluorimetric Assays of some Peptidases.in "Enzymes in clinical chemistry" Seite 11 von R. Ryssen, L. Vandendriessche. Elsevier Publishing Company: Amsterdam, New York, London (1965).

59. Rydén G.: Cystine aminopeptidase and oxytocinase activity in pregnancy. Acta obstet. Gynec. scand. Vol. XLV, Suppl.3 (1966).

60. Sabatine B., Marimpietri - Pienabarca A.: Attività enzima tica della leucino - aminopeptidasi nella gravidanza e nel puerperio fisiologici. Monit. Obstet. ginec. N.S. 33, 471-483 (1861).

61. Schobel B., Wewalka F.: Die Heterogenität der Leucinaminopeptidase. Untersuchung von Organen und Serum bei Leber-, Gallen- und Pancreaserkrankungen. Klin.Wschr. 40, 1048-1056 (1962).

62. Schön,H., Räßler B., Weyergraf H.J.: Zur Bestimmung der LAP - Aktivität im Serum. Z.klin. Chem. 1, 73-78 (1963).

63. Semm K.: Die Standardisierung von Hypophysenhinterlappenextrakt am isolierten Rattenuterus. Nauyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. 220, 477-481 (1953).

64. Semm K.: Das Wehenproblem mit besonderer Berücksichtigung des Oxytocin-oxytocinase Haushaltes. (Beilageheft zur Zeitschr. Geburtsh. 154 (1960).

65. Semm K.: Oxytocin: Abbau durch Enzyme. Gynecol. 159, 61-63 (1965).

66. Semm K.: Die Konzentration der Serum-Oxytocinase am Ende der Tragzeit. Zbl. Gyn. 84, 1165 (1962).

67. Semm K.: Nachweis der Serum - Oxytocinase im normalen und pathologischen Placentagewebe. Arch. Gynäk. 198, 149-151 (1963).

68. Semm K. III. Body Fluids and Tissues Capable of Enzymatically Inactivating neurohypophysisial Hormones. In Handbook of Experimental Pharmakology XXIII. S. 110-115 von O. Eichler, A.Farah, H. Herken. A. D. Welch.Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York.

69. Semm K., Waidl E.: Histochemische Untersuchungen über die Serumoxytocinase - Bildung im menschlichen Trophoblasten. Z. Geb. und Gyn. 158, 165-171 (1962).

70. Semm K., Wiendl H.J.: Über oxytocininaktivierende Gewebeextrakte. Zbl. Gynäk. 84, 1669 (1962).

71. Sitzmann F.C., Geiger S.: Untersuchungen der LAP - Aktivität bei gesunden und kranken Kindern. Medizin und Ernährung 10, 221-223 (1967).

72. Sjöholm I.: Enzymatic inactivation of oxytocin. Acta chem. Scand. 18, 889-898 (1964).

73. Smith E., Polyglase W.J.: The specifity of Leucineaminopeptidase. J. Biol.chem.180, 1209-1223 (1949).

74. Smith E., Rutenberg A.: Studies of serum aminopeptidase in pregnancy, hydatideform mole, and choriocarcinoma. Am.J.Obstet. Gynec. 96, 301-304 (1966).

75. Smith E., Pineda E., Rutenberg A.:
Localization of serum leucine aminopeptidase activity by paper electrophoresis. Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.) 110, 683-687 (1962).

76. Titus A.M., Reynolds D.R., Glendening M.B., Page E.W.:
Plasma aminopeptidase activity (oxytocinase) in pregnancy and labour. Am. J. Obstet. Gynec. 80, 1124-1128 (1960).

77. Tuppy H., Nesvadba H.: Über die Aminopeptidaseaktivität des Schwangerenserums und ihre Beziehung zu dessen Vermögen, Oxytocin zu inaktivieren. Klin. Chem. 88, 977-982 (1957).

78. Tuppy H., Wintersberger E.: Reinigung und Eigenschaften der Serumoxytocinase. Mh.Chem. 91, 1001-1010 (1950).

79. Umbenaun V.: Unveröffentlichte Untersuchungen.

80. du Vignaud V., Ressler C., Swan J.M., Roberts C.W., Katsoyannis P.G.: The Synthesis of Oxytocin. J. Amer. Chem. Soc. 76, 3115-3121 (1954).

81. Werle E., Effkemann G.: Über die oxytocinabbauende Fähigkeit des Schwangerenblutes. Arch. Gynäk. 171, 286-290 (1941).

82. Werle E., Semm K.: Über die Oxytocinase des Schwangerenblutes. Arch. Gynäk. 187, 449-457 (1956).

83. Wippert L., Severidt E., Kallmann L., Hillmer T., Deutzfeld W.: Serum-Enzymaktivitäten und Bromsulfaleinretention unter Ovulationshemmern. Deut. Med. Wschr. 46, 2207-2210 (1968).

84. Wintersberger E., Chatterjee K.P.: Reinigung und Eigenschaften einer Aminopeptidase der menschlichen Erythrocyten. Mh. Chem. 93, 1268-1278 (1962).

85. Wintersberger E., Tuppy H.: Zonen - Elektrophorese von Aminopeptidasen im Stärkegel. Mh. Chem. 91, 406-411 (1960).

86. Zsolnai B., Somogyi J., Szarvas Z., Puská E.: Über die Rolle der eiweißspaltenden Enzyme in der Schwangerschaft. I. Das Verhalten der LAP im Serum und in der Placenta. Acta chir. Acad. Sci. Hung. 5, 207-218 (1964).

G. Lebenslauf:

Ich, Gudula Witzik, wurde am 2. 12. 1944 in Glandorf / Kreis Osnabrück als Tochter des Kaufmanns Friedrich Witzik und seiner Ehefrau Gertrud, geb. Polewky geboren. Nach vierjähriger Grundschule besuchte ich ab 1955 das Gymnasium in Osnabrück, wo ich 1964 das Abitur bestand.
Im SS 1964 begann ich in Tübingen mit dem Medizinstudium und legte dort 1965 das Vorphysikum und 1966 das Physikum ab. Nach einem Semester in Hamburg setzte ich das Studium in Tübingen fort und bestand im Februar 1970 das Staatsexamen.

Druck: Polyfoto Dr. Vogt KG
Stuttgart 1, Königstraße 51
Telefon 295681

Druck: Polyfoto Dr. Vogt KG
Stuttgart 1, Königstraße 51
Telefon 295681